

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

**ÉTUDE DE LA FONCTION PHAGOCYTAIRE DU S.R.E. (*)
AU COURS DU DÉVELOPPEMENT
DE TUMEURS MALIGNES EXPÉRIMENTALES
CHEZ LE RAT ET LA SOURIS**

par G. BIOZZI, C. STIFFEL, B. N. HALPERN et D. MOUTON (**).

*(Laboratoire de Médecine expérimentale
de la Clinique Propédeutique de l'Hôpital Broussais
[Professeur PASTEUR VALLERY-RADOT],
C. N. R. S., et Centre de Recherches Allergiques
de l'Association Claude-Bernard)*

On ne sait rien ou presque rien sur les causes qui déterminent l'apparition d'un processus néoplasique spontané, ni sur les mécanismes de défense mis en œuvre par l'organisme contre le développement et l'invasion des cellules néoplasiques. On s'est souvent demandé si le S. R. E., qui est considéré comme un système cellulaire de défense, jouait un rôle dans l'établissement et l'évolution du processus néoplasique. De nombreuses recherches ont été conduites, principalement du point de vue histologique, sur les modifications du S. R. E. dans les néoplasies

(*) S. R. E. = Système réticulo-endothélial.

(**) Manuscrit reçu le 7 février 1958.

spontanées ou expérimentales. Une synthèse des anciens travaux sur ce sujet a été faite par Stern [4]. Cet auteur a montré ensuite que les cellules de Kupffer des souris de souches à basse incidence de cancer présentaient une activité fonctionnelle plus importante que celle des souris de souche à haute fréquence de cancer [2]. La réponse immunitaire suit la variation de l'activité phagocytaire du S. R. E. dans ces deux souches de souris [3]. Plus récemment, Baillif [4] a montré que la fixation du thorostrat dans les cellules du S. R. E. avait une action sur la croissance de la tumeur à ascite d'Ehrlich.

L'importance du rôle joué par les mécanismes de défense de l'organisme dans le développement des néoplasies a été mise en évidence par des travaux récents [5, 6], bien que la nature du processus défensif ne soit pas précisée.

L'application de nos méthodes de mesure de l'activité phagocytaire du S. R. E. [7, 8, 9], dans différents états pathologiques, nous a montré que cette fonction est fortement stimulée au cours de certaines infections [10, 11] ou après l'injection d'endotoxines bactériennes [12]. Il nous a paru intéressant d'étudier quantitativement la fonction phagocytaire du S. R. E. au cours des processus néoplasiques.

Dans le présent travail nous étudierons la fonction phagocytaire du S. R. E. pendant le développement de l'épithéliome atypique T-8 (tumeur de Guérin [13]) chez le rat [14] et de la tumeur d'Ehrlich chez la souris. La fonction phagocytaire du S. R. E. est étudiée par la mesure de la cinétique de l'épuration sanguine d'une suspension colloïdale de carbone dont les particules sont phagocytées exclusivement par les cellules du S. R. E. [7, 8, 9]. Elle est exprimée par l'« index phagocytaire K » qui mesure l'activité globale du S. R. E. de l'animal et par l'« index phagocytaire corrigé α » qui définit cette fonction par unité de poids des organes actifs : foie et rate. Ces organes contiennent 90 p. 100 des cellules dont la fonction phagocytaire est explorée par cette méthode.

TECHNIQUE.

Nous avons utilisé des rats et des souris albinos de souche sélectionnée.

TRANSMISSION DE L'ÉPITHÉLIOME ATYPIQUE T-8 CHEZ LE RAT. — La tumeur est prélevée stérilement d'un rat greffé depuis quinze à vingt jours. A partir des parties périphériques de la tumeur, on prépare des greffons d'environ 50 mg qui sont

implantés dans le tissu sous-cutané de la partie médiane du dos des animaux receveurs.

TRANSMISSION DE LA TUMEUR D'EHRLICH CHEZ LA SOURIS. — La transmission est effectuée à partir d'un exsudat péritonéal prélevé dix jours après l'inoculation. La transmission de la tumeur a été faite suivant trois voies différentes :

a) Voie péritonéale : 0,10 ml d'exsudat.

b) Voie sous-cutanée : 0,10 ml d'exsudat dans le tissu sous-cutané de la partie médiane du dos.

c) Voie intraveineuse : l'exsudat péritonéal est prélevé dans une seringue contenant une solution de citrate de sodium 5 p. 100 dans la proportion de 1 ml de solution de citrate pour 4 ml d'exsudat. Ce mélange est dilué en parties égales avec du NaCl 9 p. 1 000. Le produit est injecté lentement par voie veineuse à la dose de 0,20 ml par 20 g.

MESURE DE L'ACTIVITÉ PHAGOCYTAIRE DU S. R. E. — La suspension colloïdale de carbone (C-11-1431/a Gunther Wagner, Hanover) est injectée par voie veineuse à la dose de 8 mg pour 100 g chez le rat et de 16 mg pour 100 g chez la souris. Les souris porteuses d'une tumeur ascitique avec exsudat péritonéal important et qui supportent mal l'injection de 16 mg de carbone pour 100 g reçoivent une dose de 8 mg pour 100 g mais la valeur de l'index K est toujours calculée pour la dose de carbone de 16 mg pour 100 g, en considérant que le produit de la dose injectée (D) par l'index phagocytaire (K) est constant. La courbe d'épuration sanguine du carbone est établie suivant les techniques préalablement décrites [7, 8, 9].

L'index phagocytaire K est calculé d'après la formule :

$$\frac{\text{Log Ct} - \text{Log Ct}'}{t' - t} = K.$$

Ct = concentration sanguine du carbone au temps t.

L'index phagocytaire corrigé α est calculé d'après la formule :

$$\frac{Pc}{Po} \sqrt[3]{K} = \alpha$$

Pc = poids du corps.

Po = poids des organes (foie et rate).

Chez les animaux porteurs de tumeur ou d'ascite, la dose de carbone injectée est calculée sur le poids total de l'animal.

Après l'expérience, les animaux sont sacrifiés et le poids de la tumeur et des métastases ou du liquide ascitique est établi. L'index phagocytaire K est toujours calculé pour une dose de carbone

qui correspond au poids réel de l'animal, obtenu en soustrayant du poids total le poids de la tumeur ou du liquide ascitique. Ce calcul peut être effectué en utilisant la formule : $K \times D = \text{constante}$ ($D = \text{dose de carbone injectée}$).

Le rapport $\frac{P_c}{P_o}$ est établi en considérant le poids réel de l'animal obtenu après soustraction du poids de la tumeur ou du liquide ascitique.

MESURE DU FLUX SANGUIN INTRA-HÉPATIQUE CHEZ LA SOURIS. — La mesure de la circulation hépatique est effectuée par l'étude de la cinétique de l'épuration sanguine d'une dose de 100 µg pour 100 g d'un complexe albuminique (C. A.) marqué au ^{131}I , dont les particules sont phagocytées pour 96 p. 100 par les cellules de Kupffer [15].

TABLEAU I. — Mesure de l'activité phagocytaire du S. R. E. chez des rats greffés avec l'épithéliome atypique T-8.

	Poids au départ	Poids au jour du test	Index phagocytaire $\frac{P_c}{K}$	$\frac{P_c}{P_o}$	Index phagocytaire α	Foie en g/100g	Rate en g/100g	Poids tumeur + métastases g	Métastases lymphatiques	Ulcération de la tumeur
8 jours après la greffe	137	138	0,024	22,4	6,5	4,130	0,330	0,250		
	151	152	0,030	19,9	6,2	4,450	0,560	0,200		
	110	126	0,035	18,4	6,0	5,050	0,400	0,150		
	152	147	0,036	17,2	5,7	5,150	0,680	0,400		
	128	176	0,036	19,6	6,5	4,650	0,420	0,300		
	122	150	0,066	16	6,5	5,750	0,530	2,200		
	138	170	0,082	17,3	7,5	5,100	0,680	0,950		
	142	144	0,195	15,1	8,8	5,400	1,250	0,100		
Moyenne	135	150	0,063	18,2	6,7	4,960	0,600	0,570		
Témoins : 6 rats	126	136	0,031 ± 0,005	20,9 ± 0,9	6,6 ± 0,2	4,290 ± 0,100	0,507 ± 0,220			
14 jours après la greffe	135	175	0,024	21,6	6,2	4,250	0,370	4,500	+	
	162	185	0,026	22,2	6,6	3,750	0,700	3,300		
	170	185	0,030	21,8	6,8	3,800	0,760	0,850		
	130	174	0,030	18,9	5,9	4,900	0,400	3,800	+	
	145	165	0,039	22,6	7,6	3,800	0,610	2,450		
	113	155	0,040	17,8	6,1	4,600	1,030	4,800	+	
	132	174	0,042	20,2	7,0	4,350	0,600	3,800		
	131	189	0,063	20,8	8,3	4,250	0,550	4,900		
Moyenne	175	190	0,190	14,4	8,3	5,350	1,630	5,400		
	132	177	0,054	20,0	7,0	4,300	0,700	3,760		
Témoins : 7 rats	134	172	0,030 ± 0,006	20,9 ± 1,2	6,5 ± 0,2	4,110 ± 0,200	0,064 ± 0,190			

21 jours après la greffe	121	149	0,020	17,9	4,9	4,900	0,710	15,000		
	116	173	0,037	20,8	6,9	4,450	0,350	9,200	+	+
	100	163	0,037	17,9	6,0	4,700	0,860	9,100	++	+
	110	170	0,041	19,3	6,6	4,700	0,460	12,000	++	+
	130	191	0,046	20,5	7,3	4,250	0,630	9,200	+	±
	154	173	0,062	16,1	6,4	5,300	0,870	38,000		
	156	167	0,073	20,2	8,4	4,250	0,700	28,500	+	
	100	162	0,086	15,5	6,8	5,050	1,360	10,650	+	+
	98	149	0,160	12,1	6,6	6,300	1,900	1,400		
	Moyenne	120	166	0,062	17,8	6,7	4,800	0,820	14,800	
Témoins 6 rats	127	189	0,023	22,1	6,2	4,000	0,540			
			±0,005	± 1,6	±0,6	±0,300	±0,170			
28 jours après la greffe	114	196	0,033	21,5	6,9	4,100	0,570	31,700		
	134	222	0,042	20,8	7,2	4,400	0,400	23,700	++	
	130	154	0,042	19,2	6,7	4,500	0,720	26,000		
	157	158	0,045	16,5	5,9	5,050	1,010	39,000		
	186	198	0,047	17,2	6,2	5,100	0,680	52,000	+	
	103	162	0,072	15,4	6,4	5,740	0,740	43,500	+++	++
	132	124	0,082	17,5	7,5	5,250	0,480	32,000	+++	+
	112	166	0,088	15,5	6,9	5,750	0,720	32,500	+++	±
	109	151	0,088	15,2	6,8	5,750	0,800	31,000	++	±
	146	175	0,113	15,0	7,2	5,400	1,270	14,100	++	
	96	136	0,162	14,6	8,0	6,150	0,660	33,100	++	±
Moyenne	129	167	0,074	17,1	6,9	5,140	0,700	32,600		
Témoins 5 rats	135	223	0,022	21,7	6,1	4,030	0,600			
			±0,003	± 1,6	±0,3	±0,180	±0,180			
36 jours après la greffe	125	149	0,026	23,9	7,1	3,650	0,470	25,000		
	138	104	0,046	19,8	7,1	4,400	0,570	30,000	++	
	110	244	0,060	18,2	7,2	5,000	0,490	non dé- veloppée		
	145	165	0,075	15,1	6,4	6,000	0,485	62,000	++	+
	92	171	0,080	13,7	6,0	5,700	1,550	14,300	+++	
	114	148	0,130	12,3	6,3	6,850	1,250	21,400	+++	±
	Moyenne	121	163	0,070	17,1	6,7	5,100	0,800	30,500	
Témoins 5 rats	129	210	0,020	20,6	5,7	4,150	0,700			
			±0,004	± 1,4	±0,3	±0,200	±0,150			

La quantité de sang qui passe à travers le foie par minute peut être évaluée suivant la formule :

Masse sanguine $\times$ Ke = circulation hépatique en ml/min.

Ke = index phagocytaire K calculé en logarithmes népériens (Ke = $K \times 2,3$).

RÉSULTATS.

RATS GREFFÉS AVEC L'ÉPITHÉLIOME ATYPIQUE T-8. — La tumeur transmise se développe chez 95 p. 100 des rats greffés. Dans le tableau I, nous présentons les résultats obtenus en explorant la fonction phagocytaire du S. R. E. à des intervalles de temps variés

à partir du moment de la greffe de la tumeur. En raison des différences observées, d'un animal à l'autre, chaque rat est présenté séparément. Les valeurs des index établis chez les rats témoins de chaque lot sont reportées comme moyenne avec leur déviation standard.

Les rats greffés depuis huit jours montrent une augmentation du pouvoir phagocytaire du S. R. E. mesurée par l'index K qui est, en moyenne, deux fois plus grand que celui des rats témoins. Cependant, cet effet n'est pas homogène : sur les 8 rats testés, il y en a 2 qui présentent une activité phagocytaire normale, 3 qui sont à la limite supérieure de la déviation standard des témoins et 3 dont le pouvoir phagocytaire du S. R. E. est fortement augmenté. L'activité phagocytaire par unité de poids du tissu hépato-splénique exprimée par l'index α est augmentée seulement chez 2 rats. Cela relève du fait que les rats greffés présentent une légère augmentation du poids du foie.

Les rats greffés depuis quatorze jours montrent une activité du S. R. E. qui se répartit d'une manière semblable à celle des animaux du groupe précédent, bien que le poids moyen de la tumeur soit passé de 0,57 g à 3,76 g.

Au bout de vingt et un jours, la tumeur est considérablement développée et, chez 6 rats sur 9, il y a une invasion métastatique des ganglions axillaires ou inguinaux. On observe également, chez plusieurs rats, l'ulcération de la tumeur primitive. L'activité phagocytaire du S. R. E., exprimée par l'index K, est significativement augmentée chez 8 rats sur 9. Cette augmentation est encore plus évidente chez les animaux étudiés au vingt-huitième jour. Tous les rats présentent une élévation significative et souvent importante de l'index K. Chez 8 rats sur 11, l'index α est également augmenté, bien que l'on constate toujours une augmentation du poids du foie chez les animaux porteurs de cette tumeur. A cette période la tumeur est très développée, souvent ulcérée et le système lymphatique est infiltré par de nombreuses et grosses métastases.

L'accroissement corporel des rats greffés est normal jusqu'au quinzième jour, par la suite il se ralentit nettement par rapport à celui des rats témoins. Parallèlement, on observe une diminution progressive du taux de l'hémoglobine chez les rats greffés. Au trente-sixième jour, ces rats présentent un aspect physiologique précaire et certains d'entre eux meurent spontanément.

L'index phagocytaire K est augmenté chez presque tous les rats qui ont aussi un foie de poids supérieur à la normale.

Cette expérience montre, dans son ensemble, que la fonction phagocytaire du S. R. E. est stimulée pendant l'évolution de l'épithéliome atypique T-8 chez le rat. Cette augmentation, qui n'est pas constante durant la phase initiale du développement

de la tumeur, devient évidente chez presque tous les animaux lorsque les tumeurs atteignent une phase plus avancée. Cependant, il ne semble pas y avoir de parallélisme entre le poids de la tumeur ou le degré d'invasion métastatique de l'organisme et l'élévation de l'index phagocytaire de l'animal.

Il est à remarquer que l'index K tend à devenir légèrement plus bas chez les lots de rats témoins qui ont un poids corporel plus grand. Ce phénomène que nous avons remarqué précédemment [16] rend plus significative l'augmentation de la valeur de l'index K observée durant les phases plus avancées du développement de la tumeur.

Nous n'avons jamais observé de fixation de carbone dans les tissus de la tumeur, ni dans les métastases du système lymphatique.

TUMEUR D'EHRlich INOCULÉE PAR VOIE SOUS-CUTANÉE. — L'exsudat péritonéal de la tumeur ascitique inoculé par voie sous-cutanée produit une tumeur localisée qui se développe progressivement. Cette tumeur reste localisée et ne donne pas de métastases visibles. L'état général des souris et leur accroissement pondéral n'est pas affecté par le développement de la tumeur. La teneur en hémoglobine du sang des souris porteuses de la tumeur depuis vingt-sept jours est normale. Les parties centrales de la tumeur deviennent rapidement nécrotiques.

Les résultats de l'étude de la fonction phagocytaire du S. R. E. sont reportés dans le tableau II. Nous constatons que l'activité

TABLEAU II. — Mesure de l'activité phagocytaire du S. R. E. chez des souris inoculées avec la tumeur d'Ehrlich par voie sous-cutanée.

Jours après l'inoculation	Nombre de Souris	Poids en g	Index phagocytaire K	$\frac{P_2}{P_0}$	Index phagocytaire α	Rate en g/20g	Foie en g/20g	Poids de la tumeur en g
2	5	20	0,031	14,6	4,5	0,196	1,180	-
4	6	20	0,022	15,3	4,2	0,210	1,120	< 0,1
14	7	26	0,029	12,7	3,8	0,260	1,320	2,100
27	5	24,5	0,024	10,7	3,1	0,360	1,510	8,100
Témoins	20	24,5	$\pm 0,025$ $\pm 0,010$	$\pm 14,8$ ± 2	$\pm 4,3$ $\pm 0,6$	$\pm 0,216$ $\pm 0,120$	$\pm 1,150$ $\pm 0,190$	

globale du S. R. E. (index K) n'est pas modifiée au cours du développement de la tumeur. L'activité phagocytaire par gramme d'organe (index α) diminue entre le quatorzième et le vingt-septième jour. Ce phénomène est dû à une augmentation du poids du foie et de la rate.

TUMEUR ASCITIQUE D'EHRLICH. — Les souris inoculées par voie intrapéritonéale développent rapidement une ascite volumineuse. A partir du dixième jour, les souris manifestent un état général précaire et certaines succombent spontanément.

Vers le quinzième jour après l'inoculation, la mortalité est de 40 p. 100. Ces souris supportent mal l'injection de 16 mg pour 100 g de carbone et, pour cette raison, nous avons exploré l'activité du S. R. E. avec la dose de carbone de 8 mg pour 100 g.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau III, comme valeurs moyennes pour chaque groupe de souris testés à différentes périodes de l'évolution de la tumeur ascitique.

TABLEAU III. — Mesure de l'activité phagocytaire du S. R. E. chez des souris inoculées avec la tumeur ascitique d'Ehrlich.

Jours après l'inoculation	Nombre de Souris	Poids en g	Index phagocytaire K	Pc Po	Index phagocytaire α	Foie en g/20g	Rate en g/20g	Volume de l'ascite en ml
4	9	22,3	0,034	14,9	4,8	1,170	0,170	<0,5
7	8	25	0,025	12,8	3,8	1,360	0,210	5,9
10	7	19,5	0,016	13,0	3,2	1,380	0,170	9,5
15	5	16,4	0,010	15,5	3,3	1,170	0,120	13,1
Témoins	21	22,5	0,030 ±0,010	14 ± 1,5	4,5 ±0,6	1,250 ±0,150	0,180 ±0,090	

On constate qu'entre le quatrième et le septième jour après l'inoculation, l'activité phagocytaire du S. R. E. mesurée par les index K et α peut être considérée comme normale. Il est à remarquer qu'au septième jour la tumeur ascitique est déjà considérablement augmentée (5,9 ml d'exsudat environ). Du dixième au quinzième jour, les valeurs des index K et α sont inférieures à celles observées chez des souris témoins. Durant cette période, il y a donc une diminution du pouvoir phagocytaire du S. R. E., soit dans son ensemble, soit par unité de poids des organes actifs (foie et rate).

A partir du dixième jour les souris manifestent une diminution progressive du poids corporel (corrigé par le volume du liquide ascitique), ainsi qu'une baisse considérable du taux de l'hémoglobine qui atteint moins de 50 p. 100 des valeurs normales.

Des expériences antérieures [17] ayant montré l'importance du facteur circulatoire dans la fonction phagocytaire du S. R. E., on pouvait se demander si la diminution de l'activité du S. R. E.

observée du dixième au quinzième jour est corrélative d'une diminution de la circulation sanguine hépatique du fait de l'existence d'une grande quantité d'exsudat péritonéal. Pour répondre à cette question nous avons mesuré le flux sanguin hépatique chez 5 souris témoins et 5 souris inoculées depuis treize jours et qui présentaient un exsudat péritonéal important.

Les résultats de cette expérience sont présentés comme valeurs moyennes dans le tableau IV. Il en résulte que, malgré la présence d'un exsudat péritonéal de 12,5 ml, les souris ont un flux sanguin hépatique qui est dans les limites des valeurs normales.

TABLEAU IV. — Mesure de la circulation sanguine hépatique chez des souris inoculées depuis treize jours avec la tumeur ascitique et chez des souris témoins.

	Nombre de Souris	Poids en g	Exsudat péritonéal en ml	K	Ke	Masse * sanguine ml/20g	Foie en g/20g	Circulation hépatique ml/mn/g de foie
Souris avec tumeur ascitique	5	21	12,5	0,395	0,910	1,6	1,420	1,03
Souris témoins	5	23	-	0,420	0,966	1,5	1,310	1,10 ±0,10

* La masse sanguine est déterminée en extrapolant au temps 0 la représentation semi-logarithmique de la concentration sanguine par rapport au temps des courbes de clearance du carbone chez des souris inoculées depuis quinze jours avec la tumeur ascitique rapportées dans le tableau III et chez des souris témoins du même lot.

Les chiffres de la circulation intra-hépatique dans les deux groupes de souris doivent être considérés comme valeur minimum, car la présence de l'exsudat péritonéal nous a empêchés d'établir le pourcentage d'efficacité de l'épuration hépatique [15].

TUMEUR D'EHRlich INOCULÉE PAR VOIE VEINEUSE. — L'injection intraveineuse de l'exsudat péritonéal provoque le développement de multiples nodules tumoraux dans les poumons des souris qui succombent dans les deux semaines qui suivent l'inoculation.

Dans le tableau V nous rapportons les moyennes des résultats obtenus en explorant l'activité phagocytaire du S. R. E. à des temps successifs après l'inoculation. Ces résultats suggèrent qu'il existe peut-être une légère augmentation des index K et α vers le cinquième jour après l'inoculation. Il est à remarquer que, le douzième jour, la mortalité est déjà de 30 p. 100 et qu'à cette période les souris survivantes sont souvent dans un état physiologique précaire et présentent un certain degré d'hypothermie.

TABLEAU V. — Mesure de l'activité phagocytaire du S. R. E. chez des souris inoculées avec la tumeur d'Ehrlich par voie intraveineuse.

Jours après l'inoculation	Nombre de Souris	Poids en g	Index phagocytaire K	$\frac{Pc}{Po}$	Index phagocytaire α	Foie en g/20g	Rate en g/20g
2	5	25	0,025	14,2	4,1	1,280	0,135
5	9	24	0,043	14,9	5,2	1,200	0,155
12	7	26	0,021	14,2	3,9	1,230	0,180
Témoins	16	24,5	0,022 $\pm 0,008$	14,4 $\pm 1,4$	4,0 $\pm 0,4$	1,260 $\pm 0,130$	0,130 $\pm 0,070$

DISCUSSION.

Les résultats observés avec les tumeurs néoplasiques montrent que le retentissement du processus néoplasique sur le S. R. E. dépend de la nature de la tumeur. La tumeur T-8 se caractérise par sa propriété de créer des métastases précoces dans l'ensemble du système lymphatique et parfois dans les organes internes. L'état général de l'animal est rapidement affecté par la néoplasie, l'accroissement corporel est ralenti, le taux d'hémoglobine baisse parallèlement à la progression de la tumeur. Par contre, les animaux inoculés avec la tumeur d'Ehrlich par voie sous-cutanée ne présentent pas de métastases visibles, leur accroissement corporel est normal et leur taux d'hémoglobine ne varie pas. On a l'impression que cette tumeur se développe localement comme un corps étranger sans que l'ensemble de l'organisme soit sensiblement affecté.

On pourrait supposer que la réaction d'hyperfonction du S. R. E. ne se manifeste que lorsque la tumeur envahit l'organisme. Cette hypothèse semble trouver une confirmation dans le fait que la même tumeur d'Ehrlich, lorsqu'elle est injectée par voie veineuse et lorsqu'elle se développe sous forme de nodules multiples dans le poumon, détermine une augmentation de l'activité phagocytaire du S. R. E. Il est vrai que ce phénomène n'est que de courte durée car le développement rapide de la tumeur produit une mortalité précoce.

Par contre, les résultats obtenus au cours du développement de la tumeur ascitique d'Ehrlich montrent une diminution progressive de la fonction phagocytaire du S. R. E. Ce phénomène ne peut pas être expliqué, comme nous l'avons montré, par un obstacle à la circulation portale du fait de la présence de l'ascite.

La diminution de la fonction du S. R. E. hépato-splénique pourrait, par contre, être expliquée par l'absorption à partir de l'exsudat péritonéal de substances, soit toxiques pour les cellules

du S. R. E., soit susceptibles d'être phagocytées par elles et, de ce fait, capables de ralentir la phagocytose de particules de carbone par un phénomène de compétition. Nous avons, en effet, montré précédemment [18, 19] que des protéines légèrement dénaturées sont fixées par les cellules R. E. et peuvent exercer un phénomène de compétition sur la phagocytose de particules de carbone injectées en même temps. On pourrait aussi se demander si la stimulation du S. R. E., que l'on observe au cours du développement de la tumeur T-8 chez le rat, peut être due à l'absorption de substances actives à partir de la masse nécrotique centrale de la tumeur. Plusieurs faits vont à l'encontre de cette hypothèse : le premier est la précocité de la réponse stimulatrice qui apparaît souvent, chez certains animaux, dès le huitième jour de la greffe, c'est-à-dire à un moment où le poids du greffon est inférieur à 1 g et où il n'y a pas encore de parties nécrotiques. D'autre part, nous n'avons pas constaté de relation directe entre le poids et l'aspect de la tumeur et ses effets stimulateurs sur le S. R. E. Enfin, la tumeur d'Ehrlich, inoculée par voie sous-cutanée, ne produit aucun changement de la fonction du S. R. E. malgré l'existence d'une grande masse de substance nécrotique.

CONCLUSIONS.

La répercussion du développement de la tumeur T-8 de Guérin greffée chez le rat et de la tumeur d'Ehrlich transmise à la souris sur le système réticulo-endothélial a été étudiée par la mesure de la cinétique de la phagocytose de particules de carbone suivant les techniques déjà décrites.

Il a été observé qu'au cours du développement de la tumeur T-8 on assiste à une stimulation de la fonction phagocytaire qui apparaît dès le huitième jour après la greffe et qui souvent s'accroît encore au cours des semaines suivantes.

Il ne semble pas y avoir de relation entre le poids de la tumeur et l'importance de la stimulation de la fonction phagocytaire.

Au cours du développement de la tumeur d'Ehrlich, les modifications de la fonction phagocytaire du S. R. E. varient suivant la voie de l'inoculation de la tumeur :

a) Lors de son inoculation par voie péritonéale, on observe une diminution de la fonction phagocytaire ;

b) Lorsque l'inoculation est faite par voie veineuse, on observe une stimulation transitoire de cette fonction ;

c) Lorsque les cellules tumorales sont inoculées par voie sous-cutanée, on ne note pas d'effet sensible sur le S. R. E.

Les mécanismes par lesquels les cellules tumorales affectent le S. R. E. sont discutés.

SUMMARY

STUDY OF THE PHAGOCYTIC FUNCTION OF THE R. E. S. IN THE COURSE OF THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL MALIGNANT TUMORS IN RATS AND MICE.

The effects of the Guérin T-8 tumor (transplanted to rats) and of Ehrlich tumor (inoculated into mice) on the R. E. S. have been studied by means of the cinetics of the phagocytosis of carbon particles, following techniques previously described.

During the development of the T-8 tumor, a stimulation of the phagocytic activity takes place. This stimulation appears on the eighth day after the transplantation and often increases during the following weeks.

There do not seem to exist any relation between the weight of the tumor and the importance of the stimulation of the phagocytic activity.

During the development of the Ehrlich tumor, the alterations of the R. E. S. phagocytic activity vary according to the route of inoculation of the tumor :

a) In the case of intraperitoneal inoculation, there is a decrease of the phagocytic activity ;

b) In the case of intravenous inoculation, there is a transitory stimulation of this activity ;

c) In the case of subcutaneous inoculation, there is no noticeable effect on the R. E. S.

The mechanisms of the phenomenon are discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] STERN (K.) et WILLHEIM (R.). *The Biochemistry of malignant Tumors*, Chemical Publishing Co, Brooklyn, 1943.
- [2] STERN (K.). *Proc. Soc. exper. Biol.*, 1948, **67**, 315.
- [3] STERN (K.) et DAVIDSON (I.). *J. Immunol.*, 1955, **74**, 479.
- [4] BAILLIF (R. N.). *Cancer Res.*, 1956, **16**, 479.
- [5] HERBUT (P. A.) et KRAEMER (W. H.). *Cancer Res.*, 1956, **16**, 1048.
- [6] SOUTHAN (C. M.), MOORE (A. E.) et RHOADS (C. P.). *Science*, 1957, **125**, 158.
- [7] BIOZZI (G.), BENACERRAF (B.) et HALPERN (B. N.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 441.
- [8] HALPERN (B. N.), BENACERRAF (B.), BIOZZI (G.) et STIFFEL (C.). *Revue Hémat.*, 1954, **9**, 621.
- [9] HALPERN (B. N.), BENACERRAF (B.), STIFFEL (C.) et BIOZZI (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 431.
- [10] HALPERN (B. N.), BIOZZI (G.), BENACERRAF (B.) et STIFFEL (C.). *Physiopathology of the Reticulo-Endothelial System*, Blackwell, édit., 1957, 204.

- [11] BIOZZI (G.), BENACERRAF (B.), GRUMBACH (F.), HALPERN (B. N.), LEVADITI (J.) et RIST (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 291.
 - [12] BIOZZI (G.), BENACERRAF (B.) et HALPERN (B. N.). *Brit. J. exper. Path.*, 1955, **36**, 226.
 - [13] GUÉRIN (M.) et GUÉRIN (P.). *Bull. Assoc. Franç. Etude Cancer*, 1934, **23**, 632.
 - [14] HALPERN (B. N.), BIOZZI (G.), GUÉRIN (M.), STIFFEL (C.) et MOUTON (D.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 760.
 - [15] BENACERRAF (B.), BIOZZI (G.), HALPERN (B. N.), STIFFEL (C.) et MOUTON (D.). *Brit. J. exp. Path.*, 1957, **38**, 35.
 - [16] STIFFEL (C.), BIOZZI (G.) et BENACERRAF (B.). *C. R. Soc. Biol.*, 1956, **150**, 1075.
 - [17] BENACERRAF (B.), BIOZZI (G.), CUENDET (A.) et HALPERN (B. N.). *J. Physiol.*, 1955, **128**, 1.
 - [18] BENACERRAF (B.), HALPERN (B. N.), STIFFEL (C.), CRUCHAUD (S.) et BIOZZI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 601.
 - [19] BIOZZI (G.), BENACERRAF (B.), STIFFEL (C.), HALPERN (B. N.) et MOUTON (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 89.
-

ACTIVITÉ ANTITUBERCULEUSE EXPÉRIMENTALE DU PYRAZINAMIDE (P.Z.A.)

par Françoise GRUMBACH (*)

(avec la collaboration technique de M^{lle} Sabine CLAVEL).

(Institut Pasteur, Service de la Tuberculose)

INTRODUCTION.

Le pyrazinamide est un dérivé du nicotinamide qui fut synthétisé en 1952 par Kushner et ses collaborateurs [1]; son activité antituberculeuse *in vitro* était faible, mais supérieure cependant à celle du nicotinamide. En 1952, les expériences de Malone et ses coll. [2] d'une part, de Solotorovsky et ses coll. [3] d'autre part, ont montré l'activité du pyrazinamide sur la tuberculose expérimentale de la souris, tandis que Dessau [4] et Steenken et Wolinsky en 1954 [5] ne lui trouvaient qu'une très faible activité sur la tuberculose du cobaye. Ultérieurement, ces mêmes auteurs, en augmentant les doses de pyrazinamide administrées, lui trouvent une activité antituberculeuse très marquée chez le cobaye, seul et en association avec d'autres antibiotiques [6].

L'intérêt du pyrazinamide a augmenté en 1954 après les rapports de Mc Dermott et ses coll. [7, 8, 9] et de Schwartz et Moyer [10] montrant l'effet antituberculeux remarquable de l'association pyrazinamide + isoniazide en clinique humaine.

L'explication de ces résultats a été exposée dans les magnifiques travaux de McCune et ses coll. [11] en tuberculose expérimentale de la souris, qui montrent que l'association pyrazinamide + isoniazide produit une stérilisation des lésions chez la souris, résultat qu'on n'obtient avec aucune des associations classiques sans PZA.

Mackness [12], par l'étude de l'activité antituberculeuse intracellulaire des médicaments, montre que, associé à l'isoniazide, le pyrazinamide augmente l'effet bactéricide de l'isoniazide.

En même temps que ces travaux et ultérieurement, d'autres auteurs, soit en clinique humaine, soit en tuberculose expérimentale, ont pu mettre en évidence et confirmé l'activité antituberculeuse très intéressante du pyrazinamide.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 février 1958.

Cependant, les accidents hépato-toxiques qu'il peut provoquer en clinique humaine ont limité son emploi jusqu'à présent, malgré son haut pouvoir bactéricide.

Les résultats que nous présentons dans ce travail sont en accord avec ceux de McCune et ses coll. ; il nous a paru intéressant de les exposer en insistant sur les particularités très spéciales de ce médicament et sur ce qu'on peut attendre de son emploi comme antituberculeux.

ACTIVITÉ *in vitro*.

Dans les conditions normales d'expérience, on ne peut pas trouver d'activité *in vitro* du pyrazinamide.

Mc Dermott et Tompsett ont montré en 1954 [13] que le PZA est actif *in vitro* seulement en milieu acide et que son activité augmente avec l'acidité du milieu. C'est ainsi qu'à pH 5,5 le PZA est actif à 25 µg/ml, tandis qu'à pH 6 il n'est actif qu'à 125 µg/ml et à pH 7 il est inactif à 400 µg/ml en milieu liquide.

D'après Mackaness, un milieu acide existerait à l'intérieur des macrophages, ce qui expliquerait l'activité du PZA sur les bacilles phagocytés, malgré le pH du milieu ambiant maintenu à un taux physiologique.

Le milieu liquide que nous avons employé pour nos titrages fut le milieu de Dubos-Tween-Albumine à pH 5,5 ou le milieu de Youmans-Albumine à pH 5,5 également. Les deux milieux nous ont donné des taux d'inhibition identiques vis-à-vis de la souche humaine H37Rvensemencée à la dose de 0,01 mg (poids humide) de bacilles pour 5 ml de milieu de culture. On note au douzième jour de culture la concentration de PZA pour laquelle n'apparaît aucune culture. La croissance de la souche H37Rv est inhibée par 25 µg/ml de PZA.

Le PZA est également actif sur les souches humaines de bacilles tuberculeux résistantes à l'INH, la SM et le PAS.

TOXICITÉ POUR LA SOURIS.

Le PZA est très peu toxique pour la souris. Dans ses expériences, McCune le donne dans la nourriture à la dose de 2 p. 100 pendant trois mois, ce qui correspond environ à 80 mg par jour et par souris de 20 g, sans observer de phénomène toxique.

Nous-même, à la dose de 30 mg par jour et par souris, en une seule prise, pendant quatre mois et demi, n'avons observé aucune toxicité pour la souris qui continue à engraisser et l'examen histologique du foie et des reins, au bout de ce temps, n'a révélé aucune lésion toxique.

Activité *in vivo*.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — Des souris blanches (race Mec-L) âgées de 28 à 32 jours, pesant de 14 à 16 g, sont inoculées par voie veineuse avec 0,05 mg (poids humide) d'une culture de 6 à 8 jours de bacilles tuberculeux humains, en milieu de Dubos-Tween-Albumine (souche H37Rv, dont la virulence pour la souris est entretenue par passages successifs sur la souris). Cette dose tue les souris en vingt à vingt-cinq jours de tuberculose généralisée avec une granulie pulmonaire typique.

Tous les *traitements* sont faits par *voie buccale* à la sonde, ce qui permet une appréciation exacte de la dose ingérée, chaque jour en une seule fois. La dose quotidienne est donnée en suspension dans l'eau gélosée à 2 p. 1 000. La voie sous-cutanée est à déconseiller pour le PZA, car elle occasionne des nécroses de la peau.

Des lots de 6 à 12 souris sont employés pour chaque dose de médicament. Un lot non traité sert de témoin.

Pour juger de l'activité du médicament, deux types de traitement sont adoptés :

1° Le traitement *abortif* dans lequel on traite les animaux dès le lendemain de l'inoculation et tous les jours pendant vingt à vingt-cinq jours jusqu'à ce que 50 p. 100 au moins des témoins soient morts. A ce moment, on sacrifie toutes les souris et on note l'importance des lésions pulmonaires par un indice qui varie de 0 à 4 (0 = pas de lésions et 4 = très nombreuses granulations blanches saillantes de 1 mm de diamètre). On calcule l'indice tuberculeux moyen pour les souris sacrifiées de chaque lot.

2° Le traitement *curatif* dans lequel on traite les animaux à partir du *quatorzième jour* après l'inoculation, au moment où de nombreuses fines granulations apparaissent sur les poumons et contiennent de nombreux bacilles en pleine multiplication, comptables sur frottis d'organes (poumon et rate). Comme nous l'avons montré antérieurement [14], le traitement tardif (curatif) permet d'étudier non seulement l'action bactériostatique, mais également bactéricide des médicaments que l'on peut suivre par la numération des bacilles, d'une part, sur frottis de poumon et de rate et, d'autre part, par culture des organes (poumon, rate, rein) des animaux sacrifiés après huit jours, quinze jours, trente jours, soixante jours, quatre-vingt-dix jours et plus de traitement. De plus, ce traitement tardif permet d'étudier l'apparition des bacilles résistants aux antibiotiques employés.

Pour la *numération des bacilles*, par culture, les organes entiers sont broyés au mortier, traités par 1 ml d'acide à 15 p. 100 (pendant dix minutes), neutralisés par de la soude à 30 p. 100

et le broyat est ainsi ensemencé sur milieu de Löwenstein-Jensen à raison de 0,1 ml par tube, sur 5 tubes, pur ou dilué au 1/10, au 1/100... suivant la richesse en bacilles de l'organe.

Le *titrage de la sensibilité* aux antibiotiques est fait pour l'INH par la méthode de Coletsos sur milieu solide de Jensen et pour le PZA en milieu liquide de Youmans à pH 5,5.

Avant de sacrifier les animaux traités, le traitement est toujours interrompu pendant deux à trois jours pour éviter que les antibiotiques accumulés dans les organes puissent gêner les cultures.

1° *Traitement abortif.* — Le PZA seul à la dose de 10 mg par jour et par souris empêche totalement l'apparition des lésions tuberculeuses en vingt jours de traitement.

Son action est comparable à celle de 0,05 mg d'INH ou de 0,5 mg de 1314 (thioamide α -éthylisonicotique [15, 16]). A la dose de 5 mg et même de 3 mg, le PZA a déjà une certaine activité antituberculeuse, comme on peut le voir dans le tableau I, d'après

TABLEAU I. — Activité sur la tuberculose de la souris.
(souche H37Rv sensible à tous les antibiotiques)

Médicaments	Doses par jour et par souris.	Mortalité au 22 ^{me} jour.	Indice tuberculeux moyen.
PZA	3 mg	0/6	2,7
	5 "	0/6	1,1
	10 "	0/6	0,16
INH	0,025 "	0/6	0,5
	0,05 "	0/6	0
PZA + INH	10 " + 0,05 "	0/6	0
1314	0,5 "	0/6	0
PZA + 1314	10 " + 0,5 "	0/6	0
TÉMOINS	0 "	4/6	4

les indices tuberculeux moyens après vingt-deux jours de traitement.

Les associations PZA + INH et PZA + 1314 (aux doses actives de chacun des médicaments employés seuls) sont très efficaces et l'effet est surtout manifeste sur le nombre de bacilles isolés par culture des organes à la fin du traitement : il est dix et cent fois inférieur à celui qu'on obtient après traitement par l'un des médicaments employé seul.

Le PZA est également actif *in vivo* sur la tuberculose de la souris inoculée avec un bacille humain résistant à l'isoniazide,

qui n'est sensible *in vivo* qu'à 1 mg d'INH (vingt fois la dose active). Dans ce cas, l'association du PZA à l'INH n'apporte rien de plus et l'effet est le même que si l'on avait employé le PZA seul (tableau II).

TABLEAU II. — Activité du PZA sur la tuberculose de la souris
(souche Hst résistante à $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ d'INH)

Médicaments	Doses par jour et par souris.	Mortalité au 25 ^{me} jour.	Indice tuberculeux moyen.
PZA	5 mg	0/6	1,2
	10 "	0/6	0,2
INH	0,5 "	0/6	3,5
	1 "	0/6	0,2
	2 "	0/6	0
PZA + INH	10 "	0/6	0,15
	1 "		
TÉMOINS	0 "	2/6	3,6

2° *Traitement curatif.* — Le PZA en traitement curatif a été employé seul et associé à l'INH.

Les résultats des deux expériences que nous exposons montrent l'importance de la dose employée et de la durée du traitement.

Première expérience : faibles doses de PZA et d'INH ; durée du traitement, quarante-neuf jours.

Deuxième expérience : fortes doses de PZA et d'INH ; durée du traitement, cent trente-cinq jours.

Première expérience : Les différents lots de souris sont traités tous les jours à partir du quatorzième jour après l'inoculation et pendant quarante-neuf jours, avec les doses suivantes :

PZA, 10 mg ; INH, 0,05 mg ; PZA, 10 mg + INH, 0,05 mg , INH, 0,1 mg ; PZA, 10 mg + INH, 0,1 mg. Témoins non traités.

100 p. 100 des témoins sont morts au vingt-huitième jour après l'inoculation, soit quatorze jours après le début du traitement. Aucun des animaux traités n'est mort au cours de l'expérience.

NUMÉRATION DES BACILLES. — Le tableau III rend compte de la numération des bacilles sur frottis de poumon et de rate au cours du traitement (aux quinzième, trente-quatrième et quarante-neuvième jours de traitement). Six souris sont sacrifiées avant le début du traitement pour examiner l'état des lésions (nombreuses fines granulations grises sur les poumons) et le chiffre moyen des bacilles comptés sur frottis est de : 23 bacilles par champ microscopique pour le poumon et 2,75 pour la rate.

D'après le tableau III, l'association PZA + INH ne semblerait

Tableau III. - (expérience I) Numération des bacilles sur frottis de poumon et de rate au cours du traitement.

Nombre de bacilles par champ microscopique.*

Médicaments: Dose par jour et par souris.	Organes	Avant traitement	Nombre de jours après traitement:		
			15	34	49
PZA 10 mg	Poumon	23	35	80	7
	Rate	2,75	1	0,6	0,6
INH 0,1 mg	Poumon	23	3,5	2,5	0,7
	Rate	2,75	1,5	0,5	0,7
PZA 10 mg + INH 0,1 mg	Poumon	23	10	5	3
	Rate	2,75	4	0,2	0,3
INH 0,05 mg	Poumon	23	15	6,5	12
	Rate	2,75	1	0,5	0,3
PZA 10 mg + INH 0,05 mg	Poumon	23	12	6,3	2,5
	Rate	2,75	3,5	0,75	0,6

* Moyenne de 2 souris et de 100 champs microscopiques par frottis d'organe.

pas meilleure que l'INH employé seul, au contraire ; il y aurait même un léger antagonisme tout au long de l'expérience. Mais cet antagonisme s'est révélé n'être *qu'apparent*, car le tableau IV montre les chiffres obtenus au quarante-neuvième jour de traite-

TABLEAU IV. - (expérience I) Comparaison du nombre de bacilles sur frottis et par la culture au 49^{me} jour de traitement

Médicaments Dose par jour et par souris.	Organes	Frottis: bacilles (par champ microscop.)	Cultures = colonies pour 0,5 ml de broyat de poumon.
PZA 10 mg	Poumon	7	5.000
	Rate	0,6	60
INH 0,1 mg	Poumon	0,7	10.000
	Rate	0,7	5.000
PZA 10 mg + INH 0,1 mg	Poumon	3	110
	Rate	0,3	8
INH 0,05 mg	Poumon	12	180.000
PZA 10 mg + INH 0,05 mg	Poumon	2,5	300

ment, selon que les numérations sont faites sur frottis ou par la culture.

Si l'on considère l'action des médicaments employés seuls, on voit que, même si les frottis des organes sont également riches en bacilles, les organes des souris traitées par le PZA donnent des cultures dix à cent fois plus pauvres que les organes des souris traitées par l'INH.

D'autre part, si l'on compare l'association PZA + INH à l'INH seul, le bénéfice de l'association n'est pas visible sur les numérations des frottis, alors qu'il se manifeste par des cultures cent à cinq cents fois plus pauvres dans le cas de l'association que dans le cas de l'INH seul.

Par conséquent, après traitement par le PZA, seul ou associé à l'INH, un très grand nombre de bacilles, visibles et colorables sur frottis, ne sont pas viables et ne cultivent pas ; nous pensons qu'ils sont morts ou incapables de se multiplier. Ceci est un effet tout à fait particulier au PZA car, chez la souris, nous ne l'avons pas observé avec d'autres médicaments.

SENSIBILITÉ DES BACILLES APRÈS TRAITEMENT. — Le titrage de la sensibilité de ces cultures de bacilles isolés après quarante-neuf jours de traitement curatif révèle qu'on trouve déjà à ce moment des bacilles résistants à l'INH après traitement par l'INH seul. Il ne s'agit pas d'une résistance homogène, les bacilles ne sont pas 100 p. 100 résistants, il reste encore de nombreux bacilles sensibles ; mais au fur et à mesure de la prolongation du traitement, la proportion de bacilles résistants augmente et ils arrivent à dépasser le nombre des bacilles sensibles. Ainsi, après quarante-neuf jours de traitement par 0,1 mg d'INH, par jour et par souris, on trouve déjà 1 p. 100 de bacilles résistants à 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ d'INH (titrage direct sur milieu solide de Jensen en boîtes de Legroux imprégnées d'antibiotique) et 1 p. 200 à 1 p. 500 de résistants à 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, ce qui paraît insignifiant à première vue, mais qui est le signe très net d'un début de résistance chez la souris, comme nous l'avons montré [17, 18] dans le traitement de la tuberculose de la souris à bacilles faiblement résistants à l'isoniazide.

Après traitement par l'association PZA + INH, tous les bacilles sont restés sensibles à 0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ d'INH.

Dans cette expérience, nous n'avons pas recherché la résistance des bacilles au PZA, mais, comme nous le verrons dans l'expérience suivante, après quarante-six jours de traitement, par le PZA seul, les bacilles sont déjà résistants à 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PZA (titrage en milieu de Youmans à pH 5,5), tandis qu'après traitement par l'association, ils sont restés sensibles à 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PZA.

TABLEAU V. — (expérience 2) Numération des bacilles sur frottis de poumon* au cours des traitements.

Médicaments Dose par jour et par souris.	Avant traitement (moyenne de 6 souris.)	Nombre de jours après traitement:				
		26	46	60	90	135
INH 0,3 mg	40	0,25 0,25	0,1 0,5	0,04 0	0,3 1	10 8 2 0,04
PZA 30 mg	40	50 > 200	40 35	2 0,25	3 2,5	5 > 200
INH 0,3 mg + PZA 30 mg	40	8 20	3 2,5	0,02 0,7 0,3	0,8 1	0,9 0,15 0,1

* Le nombre des bacilles est compté dans 100 champs microscopiques par frottis d'organe et ramené au nombre de bacilles par champ microscopique.

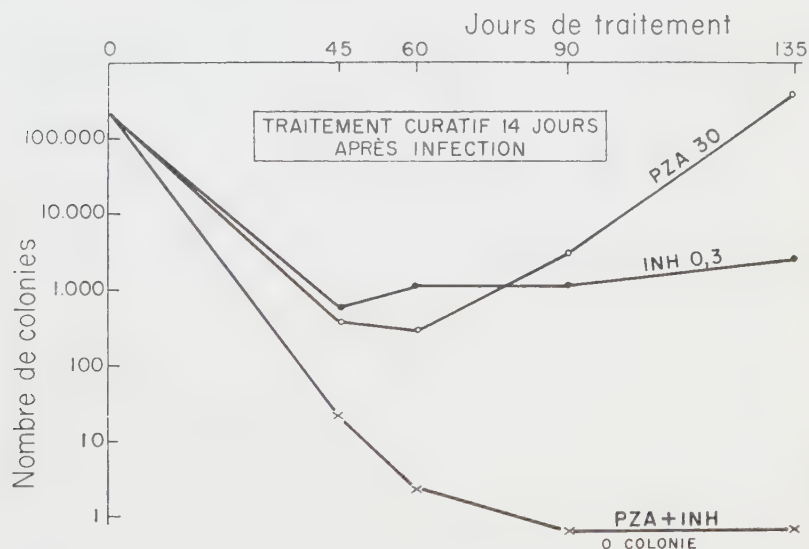


FIG. 1 (Frottis). — Nombre de bacilles (par champ microscopique) sur frottis de poumon de souris traitées par PZA seul, INH seul et l'association PZA + INH pendant cent trente-cinq jours.

Deuxième expérience. — Encouragés par les résultats de la première expérience, nous avons cherché à voir si l'on pourrait obtenir la stérilisation des lésions par l'association PZA + INH.

en augmentant les doses de chacun des médicaments et en prolongeant l'expérience au-delà de soixante jours.

Aussi, dans cette deuxième expérience, les doses employées furent les suivantes :

INH seul, 0,3 mg ; PZA seul, 30 mg, et association INH, 0,3 mg + PZA, 30 mg, par jour et par souris, et pendant cent trente-cinq jours à partir du quatorzième jour après l'inoculation. A ce moment, il y avait 40 bacilles par champ sur frottis de poumon et 3 par champ dans la rate.

Des animaux furent sacrifiés aux quarante-sixième, soixantième, quatre-vingt-dixième et cent trente-cinquième jours de traitement. Nous avons fait chaque fois la numération des bacilles sur frottis d'organes (tableau V et fig. 1) et en culture (tableau VI et fig. 2). L'étude de la sensibilité des bacilles à l'INH et au PZA a également été faite parallèlement aux cultures (tableau VI).

TABLEAU VI.—(expérience 2) Numération des bacilles par culture du poumon au cours des traitements (pour 0,1 ml de broyat)

	Médicaments. Doses par jour et par souris :					
	INH 0,3 mg		PZA 30 mg		INH 0,3 et PZA 30	
	Nombre de colonies	Sensibilité à INH.	Nombre de colonies	Sensibilité à PZA.	Nombre de colonies	Sensibilité à INH et PZA
Avant traitement	200 000	Sensible	200.000	Sensible	200.000	Sensible
46 ^e jour de traitement.	500	Sensible	400	R. à 1.000 µg	30	Sensible
	500	Sensible	400	R. à 1.000 µg	20	Sensible
60 ^e jour de traitement.	2.500	R. à 0,5 µg	400	R. à 1.000 µg	1	Sensible
	150	Sensible	150	R. à 1.000 µg	3 2	Sensible Sensible
90 ^e jour de traitement.	2.000	R. à 2 µg	2.500	R. à 1.000 µg	0 (id rate et rein)	
	150	R. à 10 µg	3.000	R. à 1.000 µg	0 " " 0 " "	
135 ^e jour de traitement.	20.000	R. à 10 µg	> 10.000	R. à 1.000 µg	0 (id rate et rein)	
	500	R. à 10 µg			0 " "	
	4.000	R. à 10 µg	> 20.000	R. à 1.000 µg	0 " "	
	1	Sensible			0 " "	

R = résistant

Comme dans l'expérience précédente, la numération des bacilles sur frottis (tableau V et fig. 1) révèle, au bout de quarante-cinq à soixante jours de traitement, un nombre de bacilles plus grand avec le PZA et même l'association PZA + INH qu'avec l'INH seul ; au quatre-vingt-dixième jour de traitement, ces chiffres se rapprochent pour être pourtant encore supérieurs à ceux de l'INH, et ce n'est qu'après cent trente-cinq jours de traitement qu'on voit nettement le nombre de bacilles augmenter considérablement après le traitement à l'INH seul ou au PZA seul, tandis que l'association PZA + INH se révèle d'une activité très supérieure à chacun des antibiotiques employés seuls.

Si l'on examine le résultat des cultures (tableau VI et fig. 2) on se rend beaucoup mieux compte de l'effet bactéricide extraordinaire de l'association PZA + INH : au bout de quatre-vingt-dix jours de traitement, il y a absence totale de culture à partir

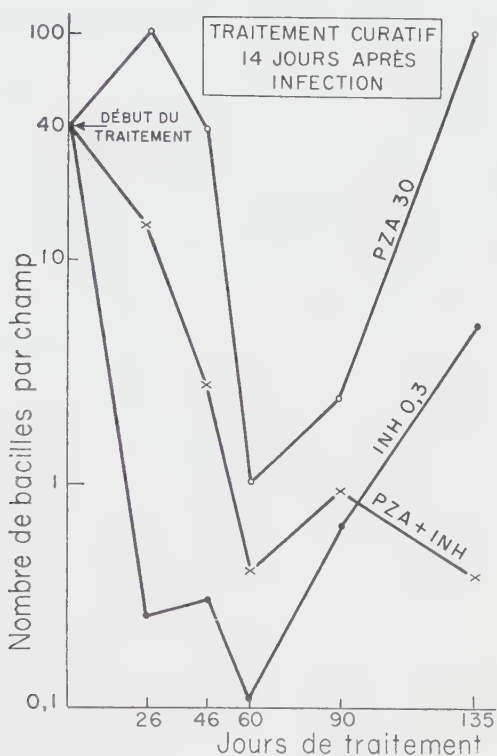


FIG. 2 (Cultures). — Nombre de colonies de bacilles pour 0,1 cm³ de broyat de poumon de souris traitées par PZA seul, INH seul et l'association PZA + INH pendant cent trente-cinq jours.

des organes (poumon, rate et rein) des animaux traités ; déjà, après soixante jours de traitement, les bacilles cultivables sont très peu nombreux. Tandis qu'avec les traitements PZA seul ou INH seul, malgré les fortes doses auxquelles ils ont été employés l'un et l'autre, on assiste, après une première phase de bactéricidie très importante au quarante-sixième jour, à l'apparition de bacilles résistants et bientôt, malgré la continuation du traitement, les bacilles recommencent à se multiplier et le titrage de la

sensibilité de ces bacilles tant au PZA qu'à l'INH confirme l'apparition des bacilles résistants.

En effet, comme on peut le voir sur le tableau VI, les bacilles résistants au PZA apparaissent de façon plus précoce que les bacilles résistants à l'INH. Déjà, au bout de quarante-six jours de traitement par le PZA seul, les bacilles de tous ces animaux sont résistants à 1 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de PZA (titrage indirect en milieu liquide de Youmans à pH 5,5) et restent résistants à plus de 1 000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ au cours du traitement.

Après traitement par 0,3 mg par jour et par souris d'INH seul, les bacilles résistants ne commencent à apparaître qu'au bout de soixante jours et encore, chez un animal sur deux. Si l'apparition des résistants est plus tardive que dans la première expérience, c'est sans doute en raison de la dose d'INH employée qui est ici trois fois plus forte que dans l'expérience précédente. Au bout de soixante jours, chez une souris, 1 p. 100 des bacilles sont déjà résistants à 0,5 μg d'INH par centimètre carré et, chez l'autre souris, tous les bacilles sont encore sensibles à 0,05 μg d'INH par centimètre carré.

La résistance à l'INH augmente ensuite rapidement : au bout de quatre-vingt-dix jours de traitement, chez l'un des animaux, 33 p. 100 des bacilles sont résistants à 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et 1 p. 100 à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; chez l'autre animal, 100 p. 100 sont résistants à 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et 50 p. 100 à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Au bout de cent trente-cinq jours de traitement, une souris, sur quatre souris sacrifiées, est restée sensible à l'INH et n'a donné que quelques colonies sur les tubes de culture. Par contre, des trois autres animaux, deux ont 100 p. 100 de résistants à 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et une résistance extrême supérieure à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; le troisième a 100 p. 100 de résistance à 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et une résistance extrême supérieure à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. De plus, la catalase de ces trois derniers animaux était très faible tandis que, jusque-là, les catalases des souches isolées des animaux traités étaient restées très élevées en raison du nombre important de bacilles sensibles qui persistaient.

Les cultures isolées aux quarante-sixième et soixantième jours à partir des organes des souris traitées par l'association PZA + INH se sont toutes montrées sensibles à 0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ d'INH et 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PZA. Ultérieurement, les cultures ont toutes été négatives dans ce lot.

De plus, avec l'association PZA + INH, les lésions tuberculeuses qui existaient au début du traitement ont guéri et, même à l'examen histologique, on ne trouve plus trace de ces lésions. (Nous remercions M. le Dr J.-C. Levaditi qui a bien voulu faire ces examens histologiques pour nous.)

EVOLUTION APRÈS ARRÊT DU TRAITEMENT. — Des animaux conservés en vie après l'arrêt du traitement pendant cent trente-cinq jours par l'association PZA, 30 mg + INH, 0,3 mg, ont été sacrifiés deux mois après l'arrêt du traitement. Aucune lésion pulmonaire n'avait apparu, mais cependant la culture des organes de ces souris a donné *quelques* colonies réparties de la façon suivante :

	SOURIS 1 (*)	SOURIS 2
Poumon	0 sur 5 tubes	0 sur 5 tubes
Rate	45 par tube	4 pour 5 tubes
Foie	2 pour 5 tubes	2 pour 5 tubes
Rein 1	0 pour 5 tubes	0 pour 5 tubes
Rein 2	4 pour 5 tubes	0 pour 5 tubes

(*) Nombre de colonies pour 5 tubes de milieu de Löwenstein-Jensen ensemencés avec 0,1 cm³ de broyat d'organe.

L'examen des frottis de poumon et de rate de ces souris a montré, comme dans tous les animaux de cette série, au cours du traitement, des bacilles dans le poumon (12 bacilles pour 100 champs microscopiques) et dans la rate (6 pour 100 champs microscopiques) et, fait très curieux, leur nombre n'a pas augmenté depuis l'arrêt du traitement. Par conséquent, là encore, tous les bacilles visibles sur frottis ne sont pas viables puisqu'on n'a obtenu aucune colonie par culture du poumon de ces souris.

De plus, le titrage de la sensibilité au PZA et à l'INH de ces quelques colonies isolées, deux mois après l'arrêt du traitement, a montré qu'elles étaient parfaitement sensibles aux deux antibiotiques.

Il y a donc là un fait très particulier au PZA.

Mc Cune, dans son mémoire, a longuement discuté de ces bacilles, restés parfaitement sensibles et qui se révèlent viables seulement plusieurs mois après l'arrêt du traitement.

Nous pensons que la plus grande partie des bacilles que nous voyons sur frottis seraient morts et incapables de se multiplier. Cependant, quelques-uns seraient dans un état de « latence » et pourraient « revivre » et cultiver après plusieurs mois d'arrêt du traitement. En prolongeant le traitement associé bien au-delà de cent trente-cinq jours, peut-être pourrait-on stériliser définitivement les organes des souris, puisque ces quelques bacilles sont restés sensibles aux médicaments.

Par conséquent, l'association PZA + INH arrive à guérir et à stériliser les lésions tuberculeuses déjà constituées de la souris, guérison que nous n'avons pu obtenir avec aucune autre association de médicaments ne comportant pas de PZA et qui est certainement due à l'action bactéricide du PZA.

RÉSULTATS. — Les résultats des expériences de traitements curatifs montrent qu'après une infection très sévère de la souris, qui tue les animaux en vingt ou vingt-cinq jours, on peut avec des doses relativement faibles d'INH (0,1 mg par jour et par souris) et de PZA (10 mg par jour et par souris) en association, non seulement arrêter complètement l'évolution de la tuberculose déjà installée, mais aussi provoquer une bactéricidie très importante au bout de cinquante jours de traitement, révélée par la culture des organes des animaux traités. A ce moment, les bacilles résistants commencent à apparaître chez les animaux traités par chacun des médicaments isolément et, chez ces derniers, le nombre de bacilles cultivables augmente.

Dès qu'on emploie des doses plus élevées de PZA et d'INH (30 mg et 0,3 mg), doses cependant bien inférieures à celles employées par Mc Cune, et qu'on prolonge le traitement pendant plus de quatre mois, les résultats sont encore plus spectaculaires, car on arrive à la guérison et à la stérilisation des lésions par le traitement associé PZA + INH, tandis que la maladie recommence à évoluer avec l'apparition des bacilles résistants chez les animaux traités par INH seul ou PZA seul.

Trois conditions sont nécessaires pour arriver à ces résultats : associer l'INH au PZA, employer des doses élevées de médicaments et faire des traitements prolongés.

Ces deux dernières conditions sont difficiles à appliquer en clinique humaine, étant donnés les accidents toxiques que peut provoquer le PZA, dès qu'on dépasse 2 g par jour (40 mg/kg), mais les résultats expérimentaux sont tellement extraordinaires que l'emploi du PZA en clinique ne doit pas être écarté. Le PZA semble pouvoir être d'un grand secours dans bien des cas particuliers, mais ne doit jamais être employé seul.

RÉSUMÉ.

Le pyrazinamide est un puissant antituberculeux bactéricide, dans la tuberculose expérimentale de la souris.

Lorsqu'il est employé seul, des bacilles très résistants au PZA apparaissent rapidement et la maladie recommence à évoluer.

Mais, en association avec l'INH, le PZA renforce considérablement l'action de l'INH. Il n'apparaît ni bacilles résistants à l'INH, ni bacilles résistants au PZA.

A condition d'employer des doses suffisantes de médicaments et de prolonger le traitement pendant au moins deux mois, le traitement aboutit à la guérison et à la stérilisation des lésions, phénomène qui n'a encore jamais été observé avec d'autres médicaments ou associations de médicaments dans le traitement de la tuberculose expérimentale de la souris.

SUMMARY

EXPERIMENTAL ANTITUBERCULOUS ACTIVITY OF PYRAZINAMIDE (PZA).

Pyrazinamide is a strong antituberculous bactericidal agent in experimental mice tuberculosis.

When used alone, very resistant bacilli rapidly appear and the course of the disease starts again.

In association with isoniazid, PZA considerably increases the activity of isoniazid. There does not appear any isoniazido-resistant nor PZA-resistant bacilli.

On the condition to use high enough dosages and to prolong the treatment two months at least, the mice recover and the lesions are sterilized, a phenomenon which has never been observed with other drugs or associations of drugs in experimental treatment of tuberculosis in mice.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KUSHNER (S.), DALALIAN (H.), SANJURJO (J. L.), BACH (F. L.), SAFIR (S. R.), SMITH (V. K.) et WILLIAMS (J. H.). *J. Amer. chem. Soc.*, 1952, **74**, 3617.
- [2] MALONE (L.), SCHURR (A.), LINDH (H.), MC KENZIE (D.), KISER (J. S.) et WILLIAMS (J. H.). *Amer. Rev. Tub.*, 1952, **65**, 511-518.
- [3] SOLOTOROVSKY (M.), GREHORY (F. J.), IRONSON (E. J.), BUGIE (E. J.) et O'NEILL (R.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1952, **79**, 563.
- [4] DESSAU (F. I.), YEAGER (R. L.), BURGER (F. J.) et WILLIAMS (J. H.). *Amer. Rev. Tub.*, 1952, **65**, 519-522.
- [5] STEENKEN (W. Jr) et WOLINSKY (E.). *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 367-369 (notes).
- [6] STEENKEN (W. Jr), WOLINSKY (E.), SMITH (M.) et MONTALBINE (V.). *Amer. Rev. Tub.*, 1957, **76**, 643-659.
- [7] MC DERMOTT (W.), ORMOND (L.), MUSCHENHEIM (C.), DEUSCHLE (K.), MC CUNE (R. M. Jr) et TOMPSETT (R.). *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 319-332.
- [8] MUSCHENHEIM (C.), MC DERMOTT (W.), MC CUNE (R.), DEUSCHLE (K.), ORMOND (L.), et TOMPSETT (R.). *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 743-747 (notes).
- [9] MUSCHENHEIM (C.), ORGANICK (A.), MC CUNE (R. M.), BATTEN (J.), TOMPSETT (R.) et MC DERMOTT (W.). *Amer. Rev. Tub.*, 1955, **72**, 851-855 (notes).
- [10] SCHWARTZ (W. S.) et MOYER (R. E.). *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 413-424.
- [11] MC CUNE (R. M. Jr), TOMPSETT (R.) et MC DERMOTT (W.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 763-802.
- [12] MACKANESS (G. B.). *Amer. Rev. Tub.*, 1956, **74**, 718-728.

- [13] Mc DERMOTT (W.) et TOMPSETT (R.). *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **70**, 748 (notes).
 - [14] GRUMBACH (F.). *VI^e Congrès Intern. Microbiol.*, Rome, 1953, **1**, 553-558.
 - [15] GRUMBACH (F.), RIST (N.), LIBERMANN (D.), MOYEUX (M.), CALS (S.) et CALVEL (S.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 2187.
 - [16] RIST (N.). *Atti della Societa Lombarda di Sci. med. Biol.*, Milan, 1956, **11**, 388.
 - [17] GRUMBACH (F.). *XIV^e Conf. Intern. de la Tuberculose*, New-Delhi, janvier 1957.
 - [18] RIST (N.). *Bull. de l'Un. Intern. contre la Tub.*, 1957, **27**, 227.
-

SUR LE MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES

CAS PARTICULIER DE LA SPIRAMYCINE.

par D. VIDEAU (*)

(avec la collaboration technique de M^{lle} J. BRUEL).

(Laboratoire Central d'Essais biologiques
de la Société Parisienne d'Expansion Chimique SPECIA)

Nous avons étudié dans une première note [1] certain comportement de la spiramycine *in vitro* qui apparaissait tout à fait inhabituel dans le mode d'action des autres antibiotiques.

Nous avons en effet montré, en utilisant la technique de Lederberg, que le décalque sur gélose d'une auréole d'inhibition laissée par la spiramycine fait apparaître une double zone d'un diamètre beaucoup plus grand que celui de l'auréole primitive. Les germes qui s'y trouvent subissent à retardement l'action de l'antibiotique.

Nous avons vu que le temps de latence de cet effet était de deux à trois heures. Il était donc nécessaire d'étudier ce qui se passait durant ce temps-là, pour que des concentrations sub-bactériostatiques, sans effet habituellement, parviennent à influencer de façon fort nette le développement des microorganismes soumis à leur action.

C'est ainsi que nous avons été conduits à étudier les phénomènes de *fixation* des antibiotiques sur ou dans la bactérie.

Dès 1948, les auteurs anglo-saxons ont entrepris l'étude de la *fixation* de la pénicilline. Ils ont utilisé de la pénicilline marquée par un atome de ³⁵S. Rowley et coll. [2, 3], puis Cooper et Rowley [4] purent constater que la pénicilline se *fixe* sur les bactéries, que l'autoclavage ou la formaline n'empêchent pas cette *fixation*, mais qu'un prétraitement à l'aide de pénicilline non marquée ou d'anhydride acétique prévient le phénomène. Cooper, Rowley et Dawson [5] démontrèrent à partir de culture de staphylocoques broyés que cette fixation se fait sur le cytoplasme des germes en métabolisme actif. Plus récemment, Unverricht, Koehn et coll. [6] ont repris cette étude en l'étendant à la *fixation* sur les organes sains et pathologiques.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 février 1958

Ces expériences ont été réalisées avec des doses importantes de pénicilline. L'action brutale de telles concentrations nous semble capable de limiter la portée des essais. D'autre part, l'étude au compteur de Geiger, en mettant en évidence la présence de ^{35}S , ne permet pas de savoir dans quel état se trouve la molécule de pénicilline.

Nous nous sommes orienté vers l'étude des concentrations sub-bactériostatiques et avons pu mettre en évidence des *fixations* souvent importantes d'un grand nombre d'antibiotiques. Or, après avoir été *fixés*, certains d'entre eux n'ont plus d'action sur les germes où ils se trouvent, d'autres montrent une persistance de leurs propriétés. *Nous avons donc été amené à penser que le terme « fixation » devait être entendu avec certaines réserves en attendant de plus amples informations.* A-t-on le droit d'utiliser un tel terme pour la pénicilline par exemple, alors qu'il ne s'agit peut-être que d'une utilisation partielle de la molécule par le métabolisme du staphylocoque (à l'appui de cette conception, nous pensons au rôle de facteur de croissance des très faibles doses de pénicilline pour le staphylocoque ou de streptomycine pour *Klebsiella pneumoniae* par exemple), lorsque nous voyons au contraire les très faibles doses de spiramycine poursuivre après *fixation* leur action antibiotique ?

S'il nous était possible d'envisager une expérimentation telle que celles que nous citons plus haut, il nous semble que les conditions idéales, pour étude de la *fixation* de la spiramycine, consisteraient à pouvoir conduire de front le titrage biologique de la quantité *fixée* et le contrôle au compteur du comportement d'un produit marqué en plusieurs points de la molécule, de manière à savoir dans quel état se trouvent les molécules *fixées*.

I. — ETUDE DE LA « FIXATION »

PAR TITRAGE BIOLOGIQUE DIFFÉRENTIEL.

a) PRINCIPE ET TECHNIQUE. — Il s'agit de calculer la quantité d'antibiotique qui disparaît dans le temps, lorsqu'on met en présence une certaine masse de germes vivants et des quantités sub-bactériostatiques du produit.

Pour donner la précision voulue à cet essai, il est nécessaire de s'assurer qu'entre la gamme elle-même et les points de celle-ci, qui vont permettre d'étudier le phénomène, tous les éléments sont strictement identiques.

a) *Préparation des germes.* — Pour avoir une *fixation* satisfaisante, il faut récolter des germes en métabolisme actif. Lors de nos essais, la récolte en bouillon d'une culture de dix-huit heures sur boîte de Roux était telle que l'on avait 150 mg de staphylocoque (état humide) par millilitre.

β) *Préparation des tubes pour la « fixation » des antibiotiques.* — Partant de solutions mères en bouillon A, B, C, D, E, on prépare :

1° La gamme *a, b, c, d, e*, en mettant 2 ml des solutions mères et 2 ml de bouillon nutritif.

2° Les tubes dans lesquels aura lieu la fixation (*b, d*, intercalés entre les points de la gamme) en mettant 2 ml des solutions mères correspondantes et 2 ml de la suspension du germe, préparée dans le même bouillon.

Cet ensemble, tubes de la gamme et tubes de fixation, est préparé en trois exemplaires.

Tous les tubes sont agités et placés à l'étuve à 37°. On les retire par groupe après une heure, trois heures, cinq heures.

Les tubes contenant la suspension de germes sont centrifugés à 7 000 t/min durant quinze minutes. On recueille le surnageant à la pipette effilée. On a de cette façon :

1° La série des tubes de la gamme au temps *t* ;

2° Les tubes contenant le surnageant au temps *t* ;

3° Le culot des germes qui ont été en contact avec des concentrations déterminées de l'antibiotique durant le temps *t*.

Les solutions de la gamme et les surnageants sont dilués au demi dans le tampon le plus favorable à l'antibiotique. Le culot est remis en suspension dans 1 ml de ce même tampon.

Pour le titrage biologique des solutions et des suspensions préparées comme indiqué ci-dessus, nous utilisons une technique sur plaque avec gélose en couche mince.

Quelques essais nous ont montré que la présence du staphylocoque en suspension ne gênait pas le titrage des culots repris par du tampon.

Enfin les gammes qui subissent le même temps d'étuve que l'essai de *fixation* permettent de s'assurer que l'antibiotique ne subit pas de destruction spontanée à la température d'incubation.

b) **RÉSULTATS.** — La quantité d'antibiotique disparue ou *fixée* durant l'essai est égale à la quantité totale mise en contact moins la somme des quantités retrouvées dans le surnageant et le culot.

Les résultats permettant de classer les antibiotiques étudiés en trois groupes sont donnés dans le tableau I.

a) *Groupe I*, type pénicilline, comprendrait : pénicilline-streptomycine, tétracycline, etc.

Ces antibiotiques se caractérisent par une « *fixation* » *rapide et définitive* sur les corps microbiens. La quantité disparue lors de nos essais semble en relation avec la sensibilité du germe à l'antibiotique et la dose mise en contact.

β) *Groupe II*, type spiramycine, comprendrait : spiramycine, carbomycine, streptogramine et érythromycine.

Les antibiotiques de ce groupe mis en présence de germes jeunes disparaissent du milieu liquide *en quantité importante et progressivement croissante avec le temps de contact*.

TABLEAU I.

		Quantités de principe antibiotique disparues après contact			
		Avec	Durant		
			1 h.	3 h.	5 h.
Antibiotiques du Groupe I	Pénicilline	4 mcg	0,7	0,7	-
		16 mcg	0,68	-	0,78
	Dihydrostrepto- mycine	8 mcg	3,32	2,92	3,00
		16 mcg	5,72	5,72	5,60
	Tétracycline	8 mcg	2,04	1,90	2,10
		16 mcg	1,12	1,60	1,60
Antibiotiques du Groupe II	Spiromycine	8 mcg	<u>4,0</u>	<u>4,72</u>	<u>5,80</u>
		16 mcg	<u>2,66</u>	<u>5,94</u>	<u>7,58</u>
	Carbomycine	4 mcg	<u>> 4,0</u>	<u>> 4,0</u>	<u>> 4,0</u>
		16 mcg	<u>1,5</u>	<u>8,55</u>	<u>8,65</u>
	Streptogramine	4 mcg	<u>> 4</u>	<u>> 4</u>	<u>> 4</u>
		16 mcg	<u>3,0</u>	<u>7,2</u>	<u>11,7</u>
	Erythromycine	4 mcg	<u>0,8</u>	<u>1,72</u>	<u>1,74</u>
		16 mcg	<u>0</u>	<u>0,6</u>	<u>1,0</u>
Antibiotiques du Groupe III	Oléandomycine	8 mcg	3,82	2,82	2,22
		16 mcg	3,64	2,66	0,26
	Novobiocine	4 mcg	0,9	0,2	0
		16 mcg	0	1,2	0

Les chiffres soulignés mettent en évidence les antibiotiques du groupe II pour lesquels la quantité de principe actif fixé sur les germes croît en fonction du temps de contact.

γ) *Groupe III*, type oléandomycine, comprendrait : oléandomycine et novobiocine.

Ces antibiotiques après une première phase de « fixation » sont libérés progressivement par les germes de telle manière que dans certains essais nous avons retrouvé après cinq heures de contact la totalité de l'antibiotique utilisé dans l'expérience.

c) CAS PARTICULIER DU GROUPE DE LA SPIRAMYCINE. — La *fixation* à 0° est nulle. La *fixation* à 37° sur des staphylocoques tués par autoclavage est invariable. Elle est très faible et ne varie pas dans le temps.

L'antagonisme observé par Chabbert [7] entre certaines souches résistantes à l'érythromycine et encore sensibles à la spiramycine, pourrait bien être un antagonisme de *fixation*, l'érythromycine se *fixant* plus précocement que la spiramycine sur les bactéries. Nous avons pu vérifier en tout cas qu'une telle catégorie de souches, souches dissociées de Garrod [8], ne *fixe* plus de spiramycine pendant la durée de nos essais, lorsque les germes ont été mis en contact préalable avec l'érythromycine.

d) DISCUSSION. — Nous avons mis en évidence la disparition de quantités appréciables d'antibiotiques placés en contact avec des staphylocoques. Bien que cette disparition puisse résulter de différents facteurs, il n'en reste pas moins que, d'après nos essais, il y a toujours une interrelation entre les germes et l'antibiotique utilisé; elle se traduit par la perte d'une partie des molécules libres et titrables.

A défaut d'une connaissance du sort de l'antibiotique, le problème se pose donc de mettre en évidence le devenir des germes qui peuvent avoir absorbé ces molécules antibiotiques.

En d'autres termes, il nous faut étudier leur courbe de croissance. Nous pourrions ainsi savoir si la quantité *fixée* est définitivement perdue pour l'action antibiotique ou si nous pouvons considérer que les germes en subiront les effets par la suite.

II. — ETUDE DE LA COURBE DE CROISSANCE DE GERMES MIS EN CONTACT

AVEC DES DOSES SUB-BACTÉRIOSTATIQUES D'ANTIBIOTIQUES.

Cet essai ne nécessite pas la présence de plusieurs milliards de germes comme l'essai précédent. Nous avons donc pu travailler pour chaque antibiotique sur des concentrations plus en rapport avec leur activité sur le staphylocoque 209 P.

Nous avons choisi comme base de travail la CMI (concentration minima inhibitrice) obtenue après dix-huit heures sur le milieu nutritif utilisé pour nos essais.

a) MÉTHODE. — Les germes sont mis en présence de chaque antibiotique aux concentrations suivantes par millilitre de bouillon nutritif : CMI/10, CMI/5, CMI $\times$ 2. Ces concentrations sont réalisées en ajoutant 0,5 ml de l'antibiotique en solution dans du bouillon nutritif à 4,5 ml d'un bouillon de culture de dix-huit heures du germe.

Dans ces conditions, nous sommes bien en deçà de la CMI réelle qui a été déterminée sur 100 000 germes par millilitre, puisque celle-ci augmente avec la densité de l'inoculum. Mais ces trois concentrations ont l'avantage d'être situées dans des limites analogues pour chacun des antibiotiques et de tenir compte de l'activité de ceux-ci sur le germe étudié.

On prépare pour chaque temps de contact la série suivante :

- 1° Des témoins sans antibiotique ;
- 2° Des tubes pour le contact avec la CMI/10 ;
- 3° Des tubes pour le contact avec la CMI/5 ;
- 4° Des tubes pour le contact avec la CMI $\times$ 2.

Après agitation ces tubes sont placés à l'étuve à 37°. Une série en est retirée après une demi-heure, deux heures, quatre heures. Le contenu de chaque tube est centrifugé dix minutes à 8 000 t/min. On élimine le surnageant. On lave à l'eau physiologique lors d'une seconde centrifugation. Chaque culot, repris par 5 ml de bouillon nutritif, sert d'inoculum, à raison de 11 gouttes par tube, pour 10 tubes de 10 ml de bouillon nutritif placés au bain-marie à 37°. On prélève les tubes deux par deux après deux heures, deux heures trente, trois heures, trois heures trente, quatre heures d'incubation. On formole et on lit la turbidité à l'électrophotomètre. Après avoir fait la moyenne des résultats nous avons les éléments pour tracer trois courbes de croissance, une pour chaque concentration de l'antibiotique. Ces courbes sont comparées à la courbe de croissance du témoin.

Précisons que nous avons vérifié après filtration que l'inoculum introduit dans les tubes destinés à la courbe de croissance, n'apporte pas de traces de l'antibiotique.

b) RÉSULTATS. — Pour simplifier la lecture des résultats nous n'avons pas donné le détail de la néphélométrie obtenue avec les antibiotiques qui se sont montrés sans action résiduelle.

Disons simplement que les doses sub-bactériostatiques des antibiotiques suivants : pénicilline, streptomycine, chloramphénicol, tétracycline, bacitracine, néomycine, novobiocine, n'ont aucun effet sur la courbe de croissance des germes qui ont été précédemment placés à leur contact.

Par contre, nous donnons les chiffres obtenus pour les antibiotiques que l'on classe généralement dans la même famille en raison de certains phénomènes de résistance croisée : érythromycine, spiramycine, oléandomycine, carbomycine. Nous avons ajouté les résultats de la streptogramine qui s'en rapproche par l'étude de *fixation* que nous avons donnée plus haut (tableau II).

Si nous comparons les résultats de ce tableau avec l'examen de la double zone [1], nous voyons une concordance parfaite : seuls les antibiotiques possédant après *fixation* sur les germes une activité résiduelle : *spiramycine*, *carbomycine*, *strepto-*

TABLEAU II. — Lecture de la turbidité des tubes à la quatrième heure de bain-marie.

Antibiotiques	Temps de contact	Concentration			
		CMI/10	CMI/5	CMI x 2	Témoin
		0,4	0,8	8,0	—
<u>SPIRAMYCINE</u>	$\frac{1}{2}$ h.	<u>57,5</u>	<u>42,5</u>	<u>32</u>	80
CMI= 4,0 mcg/ml	2 h.	<u>33</u>	<u>33</u>	<u>33</u>	86
	4 h.	<u>38,5</u>	<u>38</u>	<u>35</u>	90
		0,1	0,2	2,0	—
<u>CARBOMYCINE</u>	$\frac{1}{2}$ h.	<u>52</u>	<u>46</u>	<u>29</u>	84
CMI=1,0 mcg/ml	2 h.	<u>31</u>	<u>31</u>	<u>26</u>	88
	4 h.	<u>33</u>	<u>34</u>	<u>28</u>	91
		0,08	0,16	1,6	—
<u>STREPTOGRAMINE</u>	$\frac{1}{2}$ h.	95	<u>50</u>	<u>24</u>	95
CMI=0,8 mcg/ml	2 h.	88	<u>30</u>	<u>23</u>	94
	4 h.	98	<u>24</u>	<u>20</u>	98
		0,06	0,12	1,2	—
<u>ERYTHROMYCINE</u>	$\frac{1}{2}$ h.	98	97	99	105
CMI=0,6 mcg/ml	2 h.	102	106	107	109
	4 h.	109	107	115	115
		0,4	0,8	8,0	—
<u>OLEANDOMYCINE</u> (P.A.105)	$\frac{1}{2}$ h.	99	90	94	95
CMI=4,0 mcg/ml	2 h.	102	99	102	102
	4 h.	107	102	105	110

gramine donnent cette double zone. L'*érythromycine* donne une légère double zone très fugace, ce qui est expliqué par l'essai de *fixation* montrant que les quantités *fixées* sont faibles et que les courbes de croissance ne présentent pas de différence pour les germes qui ont subi son contact et les témoins. Le *P. A. 105* ou *oléandomycine* ne donne pas de double zone. Les courbes de

croissance le confirment et la *fixation* réversible que nous avons observée en apporte l'explication.

c) DISCUSSION. — Ces deux séries d'expériences permettent de tirer quelques conclusions sur le comportement des antibiotiques étudiés. Nous devons d'abord bien poser le problème dans le sens où nous avons voulu l'orienter. *Il s'agit ici d'une étude du comportement des bactéries et plus particulièrement du staphylocoque en présence des concentrations sub-bactériostatiques.*

Dans ces conditions, nous avons observé que les 11 antibiotiques étudiés se classent en trois familles :

1° La *famille du type pénicilline* pour laquelle la *fixation* est fonction de la concentration et reste constante et stable, sans que les quantités *fixées* soient capables d'intervenir de façon visible dans le comportement des germes.

2° La *famille du type oléandomycine*. Notons que cette classification sépare l'oléandomycine du groupe des antibiotiques présentant des réactions croisées. Pour cet antibiotique la *fixation* est réversible et les quantités *fixées* durant la première heure de contact n'interviennent pas sur le comportement futur des micro-organismes. Cet antibiotique se range donc dans la précédente famille du point de vue où nous nous sommes placé.

3° La *famille de la spiramycine*. Celle-ci se composerait de : spiramycine, carbomycine, streptogramine, érythromycine. Pour ces antibiotiques, la *fixation* augmente de façon régulière avec le temps de contact.

Les courbes de croissance montrent que des doses très faibles de produit s'accumulent sur ou dans la bactérie et, fait important, cette accumulation permet à des quantités très petites d'atteindre après deux heures par exemple (carbomycine, spiramycine) le même résultat que des quantités vingt fois plus importantes (fig. 1).

Cette famille ainsi définie, nous pouvons donner quelques renseignements complémentaires.

Ces antibiotiques se *fixent* tous les quatre, mais ils ont leurs particularités qui se traduisent par un plus ou moins grand allongement de la bande des concentrations situées entre la concentration minima inhibitrice, CMI, et la concentration minima active, CmA (telles que nous les avons définies précédemment [4]). Le phénomène s'observe sur la photo de double zone sur gélose [4] et par la méthode des dilutions. En effet, la CmA marque un arrêt net de l'action du produit (bordure nette de la double zone). A l'échelle moléculaire, et seulement pour ces antibiotiques, on peut émettre l'hypothèse, qu'en fonction du nombre de molécules par germe, au moment de la mise en contact, tout se passe comme si :

1° En dessous CmA : toutes les molécules antibiotiques vont

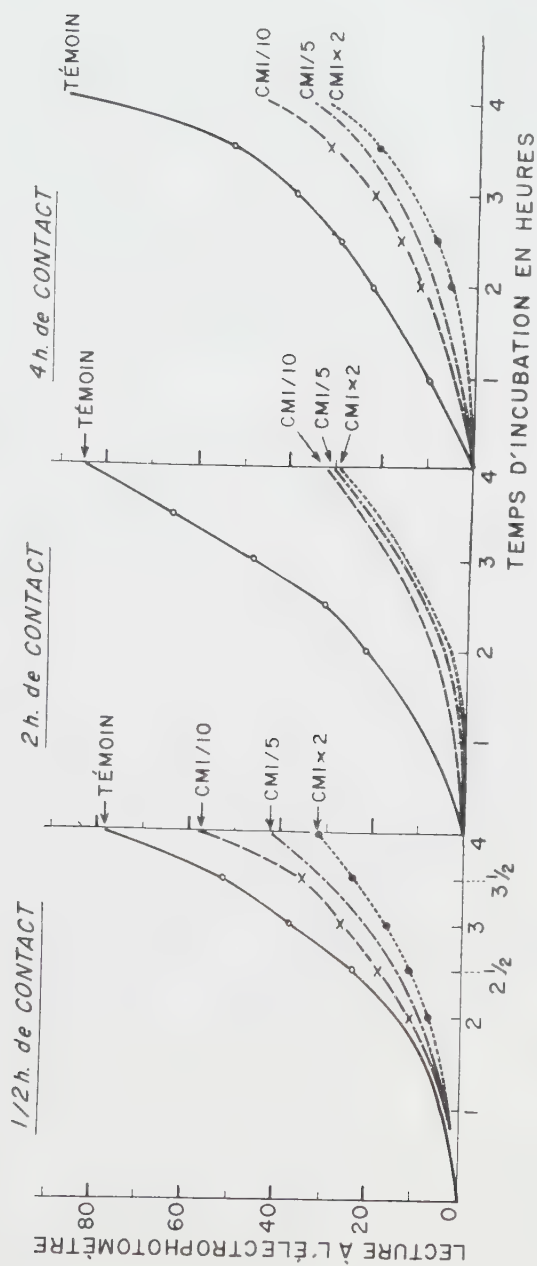


FIG. 1. — Courbes de croissance des germes après contact avec l'antibiotique (CMI/10 — CMI/5 — CMI x 2).

être assez rapidement utilisées. Elles sont en nombre trop faible pour avoir une action sur les microorganismes (cas de la streptogramine, voir tableau II CMI/10).

2° CmA : toutes les molécules seront utilisées. Leur nombre est tel qu'il permet d'atteindre, dans le temps, *le seuil d'action de l'antibiotique*.

3° Entre la CmA et la CMI : il y a beaucoup de molécules antibiotiques libres. Plus on se rapproche de la CMI plus les germes peuvent atteindre rapidement *le seuil bactériostatique*. Ce seuil ne sera pas atteint pour tous les germes. Les courbes de numération nous apprennent que quelques-uns seront tués mais que beaucoup d'autres reprendront leur développement après un temps plus ou moins long. Il ne se sera pas trouvé assez de molécules libres pour que la *fixation* se poursuive et avec elle l'effet antibiotique définitif.

4° CMI : il y a bactériostase. Dans ce dernier cas il y a suffisamment de molécules pour que les germes les rencontrent facilement. La bactériostase apparaîtra rapidement, puis la bactéricidie s'accroîtra dans le temps. Cette action antibiotique proprement dite se maintiendra tant que la bactérie sera en contact avec le produit et à condition qu'il y ait un excès convenable de molécules. Ceci peut expliquer en effet les variations de la CMI en fonction du temps et de l'inoculum.

En résumé, l'étude de la double zone, de la *fixation* et des courbes de croissance des germes soumis au contact des antibiotiques permet de penser que spiramycine, carbomycine, streptogramine et accessoirement érythromycine possèdent un seuil d'action CmA très inférieur à la CMI.

Dès que ce seuil est dépassé, toutes les molécules supplémentaires, en continuant à s'accumuler dans la bactérie, y provoquent, bien avant d'atteindre la CMI, l'apparition de l'action antibiotique du produit. Cette action est d'autant plus prolongée et plus importante que le nombre des molécules est plus élevé.

La pénicilline et les autres antibiotiques que nous avons étudiés ne possèdent pas d'action sub-bactériostatique analogue. Leur action antibiotique commence à la concentration minima inhibitrice. CmA et CMI sont pratiquement confondues.

III. — FIXATION *in vivo*.

a) PRÉLIMINAIRES. — Nous avons dans un premier temps refait l'étude des courbes de croissance des germes soumis à l'action de la spiramycine en présence de sérum. Il a suffi de centrifuger la culture de 18 heures et de remplacer le bouillon surnageant par du sérum de lapin. Pour le reste, l'essai est calqué sur le

précédent. Le résultat en est identique. Le sérum n'entrave absolument pas le phénomène, il semble même qu'il ait un effet très légèrement favorisant.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la dialyse de la spiramycine à travers les membranes de cellophane. Cette dialyse de bouillon à bouillon et de sérum à sérum est tout à fait satisfaisante.

Il était donc possible d'étudier le phénomène *in vivo*, en se réservant la possibilité de le mettre en évidence *in vitro*. Autrement dit, on pouvait, sans mettre directement la spiramycine en contact avec le staphylocoque, s'assurer qu'*in vitro*, après avoir traversé le tube digestif, elle conserve les mêmes propriétés et vient se *fixer* sur le staphylocoque dans les conditions de nos essais *in vitro*.

b) MÉTHODE ET TECHNIQUE. — On centrifuge plusieurs volumes de 5 ml d'un bouillon de culture de dix-huit heures de *Staphylococcus aureus* 209 P. On reprend les culots dans un même volume de sérum de lapin. Cette suspension du staphylocoque en sérum est placée dans des petits sacs de cellophane fermés hermétiquement. Ces sacs sont introduits après laparotomie dans la cavité abdominale de lapins de 2 kg (il faut au préalable éliminer les animaux dont le sérum présente une activité antistaphylococcique spontanée). Chaque sac peut être récupéré à l'aide d'un petit fil de lin sortant par l'incision. On referme partiellement la cavité péritonéale à l'aide d'agrafes de Michel. Un lapin témoin ne reçoit pas d'antibiotique. Les autres reçoivent, *per os*, à la sonde, des quantités croissantes de spiramycine : 50, 100, 200, 300 mg pour 2 kg. Les lapins restent fixés sur leur table à contention pendant la durée de l'épreuve.

On retire les sacs de cellophane à des temps variables, par exemple après une demi-heure, deux heures ou quatre heures. On les lave rapidement à l'eau physiologique stérile. On les sèche et la suspension de germes qu'ils contiennent est centrifugée. On lave le culot et on le reprend dans 5 ml d'eau physiologique.

Cette suspension sert, comme dans l'essai *in vitro*, à inoculer 10 tubes de bouillon qui sont placés au bain-marie à 37°. Ils sont prélevés de la même manière que ci-dessus et lus à l'électrophotomètre pour déterminer la courbe de croissance des staphylocoques.

L'essai s'accompagne pour chaque temps de contact d'un sac de cellophane dans la cavité abdominale :

- a) D'un titrage du sang du cœur à ce moment là ;
- b) D'un titrage du liquide péritonéal ;
- c) D'un titrage du sérum contenu dans le sac et qui a été récupéré après la centrifugation.

c) RÉSULTATS. — Nous les résumons dans le tableau III et la figure 2.

Nous indiquons pour chaque courbe la concentration trouvée à l'intérieur du sac de cellophane.

d) COMMENTAIRES. — Nous nous sommes évidemment placé dans

TABLEAU III. — Essai réalisé sur sacs de cellophane restés deux heures dans la cavité péritonéale après absorption orale de spiramycine.

N° des animaux	Spiramycine per os mg/kg	Concentration sang du coeur en mcg/ml	Concentration sac de cellophane en mcg/ml
Lapin n° 1	0	0	0
Lapin n° 2	50	0,20	0,20
Lapin n° 3	100	1,80	1,00
Lapin n° 4	150	4,00	2,6

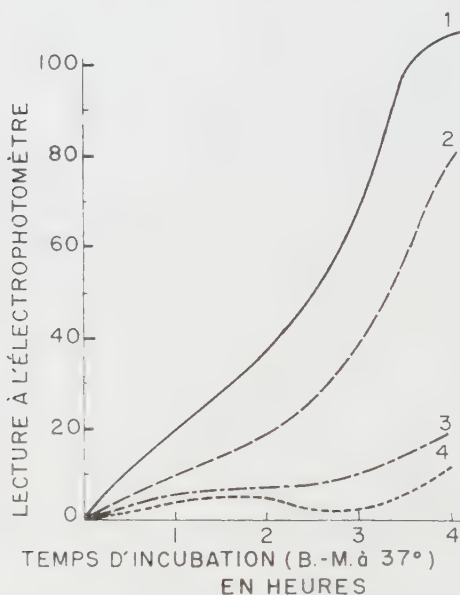


FIG. 2. — Courbes de croissance des staphylocoques après contact *in vivo*.
1, témoin. 2, 0,2 µg/ml. 3, 1 µg/ml. 4, 2,6 µg/ml.

des conditions un peu particulières : ce sont les conditions de l'essai *in vitro* transposées *in vivo*. On peut néanmoins conclure que la spiramycine donnée *per os* conserve ses propriétés de fixation après avoir traversé la paroi du tube digestif et que les staphylocoques soumis à son action, dans l'organisme, se com-

portent comme ceux de nos tubes à essais. En particulier, en dehors de toute intervention des défenses humorales, leur vitalité est grandement influencée par des doses sub-bactériostatiques et des concentrations très inférieures à celles qui testent leur sensibilité par les techniques actuelles.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Dans une première note [1] nous avons décrit le phénomène de « double zone » que donne la spiramycine lorsqu'on utilise la technique de décalque proposée par Lederberg. Nous avons attribué cette particularité, que nous ne retrouvions pas avec les antibiotiques usuels, à l'action retardée des doses sub-bactériostatiques de la spiramycine.

Dans la présente note nous étudions le comportement réciproque des germes et des différents antibiotiques que nous avons pu nous procurer. Nous nous sommes placé pour cela dans des conditions telles que la quantité d'antibiotique mise en contact avec une suspension de germes ne nuise pas à leur vitalité et qu'elle soit cependant facile à titrer pour nous permettre d'apprécier les quantités de produit actif disparues durant les essais.

Opérant avec *Staphylococcus aureus* 209 P', nous avons pu classer les antibiotiques en trois groupes :

1° Pénicilline, streptomycine, tétracycline se *fixent* rapidement en quantité déterminée, ne variant plus avec le temps de contact, comme s'il y avait « saturation » d'éventuelles liaisons germe-antibiotique.

2° Oléandomycine, novobiocine présentent une *fixation* rapide mais réversible dans le temps.

3° Spiramycine, carbomycine, streptogramine, érythromycine. Pour ces antibiotiques la quantité disparue, faible au début, s'accroît de manière importante avec le temps de contact.

Par l'étude des courbes de croissance, nous avons montré que seuls les germes qui ont subi l'action des antibiotiques du troisième groupe, conservent la trace d'une activité résiduelle importante de ces produits.

Tout ceci nous incite à penser que ces quatre antibiotiques s'intègrent au métabolisme des microcoques. Leur accumulation dans le temps au sein des bactéries fait alors apparaître un effet antibiotique important pour des concentrations beaucoup plus faibles que celles qui sont décelées par les tests de sensibilité.

L'étude *in vivo* de la spiramycine nous a permis de nous assurer que la traversée du tube digestif et la présence des liquides organiques ne modifient en rien les propriétés observées *in vitro*.

SUMMARY

MECHANISM OF THE ACTIVITY OF ANTIBIOTICS.
PARTICULAR CASE OF SPIRAMYCIN.

In a first paper, the authors have described the phenomenon of « double zone » elicited by spiramycin when Lederberg's technique is used. They attributed this phenomenon, which does not exist with usual antibiotics, to the delayed activity of sub-bacteriostatic doses of spiramycin.

In the present article, they study the reciprocal comportment of different germs and antibiotics. They adopted dosages of antibiotic which did not interfere with the viability of the germs in suspension and which nevertheless allowed easy titration, in order to be able to determine the amounts of the antibiotic which disappear during the experiments.

These experiments have been carried out with *Staphylococcus aureus* 209 P, and have allowed to classify the antibiotics into three groups :

1. Penicillin, streptomycin, tetracyclin are rapidly *fixed*, and the amount fixed does not change with the duration of contact. There seems to be a « saturation » of hypothetical bonds between germ and antibiotic.

2. Oleandomycin, novobiocin are rapidly *fixed*, but this fixation is reversible.

3. In the case of spiramycin, carbomycin, streptogramin, erythromycin, the amount which disappears is small at the beginning, then increases with the duration of contact.

The study of the growth-curves shows an important residual activity of the antibiotics observed in the third group only.

These facts suggest that these four antibiotics take part in the *Staphylococcus* metabolism. Their accumulation within the bacteria evidences an important antibiotic effect for concentrations much lower than those demonstrated by the sensitivity tests.

The *in vivo* study of spiramycin has demonstrated that its *in vivo* properties are not modified by the passage through the intestinal tract nor by the presence of organic humors.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VIDEAU (D.) et JONCHÈRE (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 202.
- [2] ROWLEY (D.), COOPER (P. D.) et ROBERTS (C.). *Biochem.*, 1950, **46**, 157.
- [3] ROWLEY (D.), MILLER (J.), ROWLAND (S.) et LESTER-SMITH (E.). *Nature*, 1948, **161**, 1009.
- [4] COOPER (P. D.) et ROWLEY (D.). *Nature*, 1949, **163**, 480.

- [5] COOPER (P. D.), ROWLEY (D.) et DAWSON (I. M.). *Nature*, 1949, **164**, 842.
- [6] UNVERRICHT (W.), KOEHN (A.), ORSER (H.), SCHATTMANN (K.) et MEHL (H. G.). *Zbl. Bakt.*, 1956, **166**, 153.
- [7] CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 787.
- [8] GARROD (L. P.). *Brit. med. J.*, 1957, n° 5036, 57.

Autres articles.

- CHABBERT (Y.), BOYER (F.), SAVIARD (M.), BOULINGRE (H.) et HERVÉ (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 760.
- CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 289.
- FAIRBROTHER (R. W.) et SOUTHALL (J. E.). *Lancet*, 1957, **2**, 974.
- JONES (W. F.), NICHOLS (R. L.) et FINLAND (M.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **13**, 338.
- LEPPER (M. H.), SPIES (H. W.), KELLOW (W. F. T.), ROSENTHAL (I. M.) et PLAUT (S.). *Antibiot. Ann.*, 1955, **56**, 659.
- LUTZ (A.), GROOTEN (O.) et HOFFERER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 778.
- LUTZ (A.) et HOFFERER (M. J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 616.
- MAS (E. A.) et JOHNSON (M. J.). *J. Bact.*, 1949, **57**, 415.
- NOYES (H. E.), NAGLE (S. C.), SANFORD (J. P.) et ROBBINS (M. L.). *Ant. et Chem.*, 1956, **6**, 450.
- ROSS (S.). *Antibiot. Ann.*, 1955, **56**, 100.
-

ASPECTS DISTINCTIFS DES LÉSIONS CELLULAIRES CAUSÉES *IN VITRO* PAR DIFFÉRENTS TYPES D'ADÉNOVIRUS

ÉTUDE DE 20 SOUCHES APPARTENANT A SIX TYPES D'ADÉNOVIRUS

par G. BARSKI et F. CORNEFERT (*).

(Centre de Recherches d'Immunopathologie,
Hôpital Saint-Antoine, Paris [Dir. : Prof. R. KOURILSKY]
et Institut Gustave-Roussy, Villejuif [Seine])

Parmi les très nombreuses souches des adénovirus humains isolées jusqu'ici, celles appartenant aux types sérologiques 3, 4 et 7, semblent être de préférence liées aux affections humaines de caractère aigu, d'allure parfois épidémique, intéressant en premier lieu les voies respiratoires. En revanche, les souches d'adénovirus qu'on isole des cas d'infections latentes ou asymptomatiques appartiennent le plus souvent aux types 1, 2 ou 5 [1, 2, 3].

Dès 1956 [4], nous avons remarqué des différences notables dans le caractère des lésions nucléaires causées *in vitro* par les virus appartenant aux types 1 et 5 (souches « Ad 71 » et « Ad 75 ») vis-à-vis de la souche « GB » de type 3 et la souche « RI 67 » de type 4. Nous avons constaté notamment que les noyaux des cellules de la souche HeLa infectées par les virus « Ad 71 » et « Ad 75 » font apparaître une vacuolisation intense, parfois explosive du noyau et un corps d'inclusion polymorphe, tandis qu'avec les souches virales de type 4 et surtout 3, cette vacuolisation est beaucoup plus discrète et que le corps d'inclusion prend de préférence la forme d'une masse centrale entourée d'un halo, le tout présentant souvent la forme d'une rosette.

Des différences dans l'aspect des lésions nucléaires entre les types d'adénovirus 1 et 2 d'une part, et 3 et 4 d'autre part, ont été remarquées par la suite également par Boyer et coll. [5] ainsi que Ginsberg [6]. Mais ces auteurs, comme nous-mêmes, ont basé leurs constatations sur l'observation d'une seule souche appartenant à chacun des types d'adénovirus étudiés.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 février 1958.

Dans ce travail, nous avons voulu établir dans quelle mesure ces différences constatées dans l'aspect des lésions se retrouvent régulièrement en rapport avec l'appartenance des adénovirus aux types sérologiques donnés.

A cette fin nous avons passé en revue 20 souches d'adénovirus de type 1, 2, 3, 4, 5 et 7 en examinant les lésions nucléaires induites par ces virus dans les cultures de la souche HeLa et accessoirement dans les cultures de différentes cellules de lapin.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

CULTURES CELLULAIRES. — Nous avons décrit précédemment notre procédé de routine des cultures cellulaires en tubes aplatis sur lamelles 12×32 mm [7], permettant soit l'obtention courante de préparations colorées soit le montage de ces mêmes lamelles dans des chambres à perfusion en vue de leur examen à l'état vivant en contraste de phase. L'étude des mêmes cultures en coupes ultramines au microscope électronique a été effectuée après fixation à l'acide osmique tamponné à 1 p. 100 et inclusion au méthacrylate, d'après les techniques habituelles [9] (1).

La technique de culture de la souche HeLa, ainsi que les techniques de fixation et de coloration sont les mêmes que celles de la précédente publication [4].

Nous préparons les cultures de trachée et de rein de lapin soit à partir des fragments explantés sur plasma, soit avec des cellules dispersées par la trypsine.

Nous employons également deux souches cellulaires de lapin provenant, l'une du testicule et l'autre de la rate de ce même animal (1). Ces deux souches adaptées à la culture *in vitro* depuis plus d'un an, ont été aimablement mises à notre disposition par le Dr Henri Febvre.

Nous nous servons pour les cultures de cellules de trachée, de rein, de testicule et de rate de lapin, d'un milieu composé de solution de Earle complétée de 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, de 0,1 p. 100 d'extrait de levure et de 15 p. 100 d'extrait embryonnaire de bovin.

VIRUS. — Nous employons au cours de ce travail les souches suivantes des adénovirus (toutes envoyées aimablement par le Dr Robert J. Huebner du N. I. H., Bethesda, U. S. A.) :

Quatre souches de type 1 : « Adenoid 71 » ; n° 63979, « Schlesinger A5 » ; n° 105205, « Grooms J. » ; n° 83338, « Pendarvis, K. ».

Six souches de type 2 : « Adenoid 6 » ; n° 80601, « N. Carter » ; n° 63714, « Bruso » ; n° 104473, « Coe J. » ; n° 105247, « Spriggs, J. » ; n° 63797, « Weller Wild, Virus I ».

(1) Nous voulons remercier vivement le Dr W. Bernhard, ainsi que le Dr H. Febvre, de l'Institut de Recherches sur le Cancer (Villejuif, Dir. Prof. Oberling) pour l'aide efficace qu'ils nous ont apportée dans cette étude.

Quatre souches de type 3 : « GB » ; n° 64392, « V. Blue » ; n° 101663, « V. Catlett » ; n° 64289, « Chang 57 ».

Une souche de type 4 : « RI 67 » (isolée par le Dr M. Hilleman).

Quatre souches de type 5 : « Adenoid 75 » ; n° 64107, « Mayeda » ; n° 106560, « Smith, M. », et n° 105211, « Thomas, M. ».

Une souche de type 7 : « Gomen » (isolée par le Dr T. O. Berge).

Nous avons cherché, dans la mesure du possible, à uniformiser le mode d'inoculation dans les tubes à lamelle destinés à l'étude cyto-logique, en introduisant à chaque fois 100 DI50 environ de virus par culture et en faisant suivre l'inoculation d'un temps d'incubation de dix minutes. Néanmoins, la rapidité d'apparition des lésions change parfois considérablement d'une souche virale à une autre.

Nos observations portent pour chaque virus sur au moins deux passages différents.

RÉSULTATS.

EN CULTURE DE LA SOUCHE HeLa. — D'une manière générale, nous avons retrouvé pour tous les virus étudiés en cultures de la souche HeLa les aspects caractéristiques d'évolution des lésions nucléaires précédemment décrits : apparition dans le nucléoplasme de zones claires dont l'aspect peut évoluer vers celui de vacuoles ou vésicules plus ou moins volumineuses, et de zones de condensation, d'affinité tinctoriale éosinophile ou ambophile, mais devenant par la suite intensément basophile. Ces zones de condensation se constituent, par élargissement et fusion, en corps d'inclusion ayant des structures intérieures et des affinités tinctoriales assez complexes. On distingue déjà, à l'état vivant au contraste de phase, des agglomérations granuleuses « cristallines » (voir pl. III, fig. 15) à côté d'étendues homogènes. Après fixation, on découvre, à l'intérieur de ces inclusions, des zones plus ou moins Feulgen positives et, à la coloration d'Unna-Pappenheim, des zones vert de méthyle positives sur un fond coloré par la pyronine avec une intensité changeante.

Cependant, des différences dans l'aspect de ces lésions apparaissent régulièrement en rapport avec l'appartenance d'une souche donnée au type sérologique. Ces différences se maintiennent au cours des passages successifs.

Ainsi, nous constatons pour les 4 souches de type 1, les 6 souches de type 2 et, presque aussi uniformément, pour les 4 souches de type 5 :

1° Au stade précoce d'infection, une tendance à la rétraction de l'ensemble de la nappe cellulaire « en maille » sans rupture des liens entre les cellules. 2° Dans les noyaux cellulaires, la formation intense des zones claires qui prennent rapidement l'aspect de monstrueuses vésicules qui gonflent et déforment à l'extrême le noyau. 3° Dans les lésions tardives, un corps d'inclusion le plus souvent en forme de masses irrégulières, polymorphes,

déposées entre les mailles de grosses vacuoles vésiculaires (pl. I, fig. 1 à 6).

Sur des cellules vivantes observées au contraste de phase, on peut constater également des noyaux fortement élargis, boursoufflés, et des éléments de corps d'inclusion multiples et polymorphes (pl. III, fig. 15). Dans les mêmes cellules fixées à l'acide osmique et observées en coupes ultraminces au microscope électronique, on retrouve des aspects de distorsion et de lobulation extrême du noyau, avec de nombreuses vacuoles dans lesquelles se déversent les particules virales en dispersion ou en agglomérations cristallines (pl. IV, fig. 17, et pl. V, fig. 18).

Par opposition, dans les cultures infectées avec les 4 souches de type 3, ainsi qu'avec la souche « Gomen » de type 7 et « RI 67 » de type 4, nous constatons :

1° Une tendance prononcée à la rétraction et l'arrondissement des cellules individuelles, avec formation d'agglomérations cellulaires denses et irrégulières, et désagrégation de la culture par effritement. 2° Dans les cellules, une vacuolisation nucléaire discrète qui se manifeste souvent par une multitude de petites vacuoles. 3° Un corps d'inclusion ramassé, peu lobulé, bien que souvent en forme de grappe, restant en position centrale, entouré d'un halo, ce qui donne fréquemment à la lésion l'aspect d'une « rosette ».

C'est dans ces inclusions ramassées et compactes que nous retrouvons au microscope électronique des agglomérations particulièrement étendues et homogènes de l'adénovirus de souche RI 67 (type 4) en arrangement cristallin (pl. VI, fig. 19). Ces images rappellent celles que Morgan et coll. ont obtenues avec les adénovirus de type 3, 4 et 7 [10].

Nous avons observé, en plus, pour les trois souches de type 3, « Blue », « Chang » et « Catlett », que l'inoculation de fortes doses de virus provoque une désintégration quasi totale des cultures en moins de vingt-quatre heures, avant même l'apparition des lésions spécifiques. Nous qualifions cet effet de toxique et ne l'observons jamais aussi prononcé avec les souches de type 1, 2 et 5.

EN CULTURES DES CELLULES DE LAPIN. — Nous constatons régulièrement, après l'introduction des adénovirus, un effet cytopathogène plus ou moins intense, avec apparition des lésions spécifiques, non seulement dans les cultures de trachée [2] ou de rein de lapin, comportant des éléments épithéliaux, mais aussi dans les cultures de deux souches cellulaires provenant de testicule et de rate de lapin. Les souches cellulaires de testicule et de rate gardent, pourtant, des caractères morphologiques propres aux cellules mésenchymateuses : cellules régulièrement fusiformes

ou polygonales pour la souche testiculaire et présence de membranes festonnées, rappelant les membranes ondulantes typiques, dans la souche splénique (pl. III, fig. 13).

Malgré les caractères mésenchymateux accusés de ces souches, elles se montrent généralement plus sensibles aux adénovirus que les cultures des tissus de lapin, même épithéliaux, la trachée incluse [2], directement explantés de l'organisme animal.

Toutefois, nous n'avons pas réussi à continuer la culture des adénovirus au-delà du quatrième ou cinquième passage en présence des cellules de ces souches, pas plus qu'en présence des cellules rénales de lapin.

Les lésions, essentiellement intranucléaires, que nous observons dans ces cultures, correspondent assez fidèlement aux stades d'évolution des lésions typiques d'adénovirus observées en souche HeLa.

Il est à remarquer qu'ici encore, certaines différences dans l'aspect et l'évolution de ces lésions se manifestent en rapport avec l'appartenance des adénovirus aux types sérologiques. Ainsi, pour les 4 souches de type 3, la souche « RI 67 » de type 4 et la souche « Gomen » de type 7, les inclusions intranucléaires apparaissent surtout comme des formations compactes, en position centrale entourées d'un halo. La vacuolisation nucléaire, si elle se manifeste, est discrète et surtout périphérique (pl. II, fig. 12, et pl. III, fig. 14). Par contre, avec toutes les souches d'adénovirus de type 1, de type 2 et de type 5 que nous avons étudiées, la vacuolisation nucléaire se révèle plus intense et le corps d'inclusion manifeste un polymorphisme prononcé (pl. II, fig. 11, et pl. III, fig. 13).

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Des données portant sur 20 souches d'adénovirus confirment nos premières observations publiées en 1956 [4] sur les différences dans l'aspect des lésions qui apparaissent en culture des cellules de la souche HeLa selon qu'elles sont infectées par les adénovirus appartenant aux types sérologiques 1, 2 et 5 ou 3, 4 et 7. Ces différences sont assez facilement perceptibles et restent per-

PLANCHE I.

FIG. 1 à 6. — Cultures de la souche HeLa infectées depuis trois jours avec les adénovirus : (fig. 1) type 1, souche « Ad 71 » ; (fig. 2) type 1, souche « Schlesinger A5 » ; (fig. 3) type 2, souche « Spriggs » ; (fig. 4) type 2, souche « Bruso » ; (fig. 5) type 5, souche « Thomas M » ; (fig. 6) type 5, souche « Smith ». Dans tous les cas, on observe une prédominance des lésions nucléaires de type « vacuolaire et polymorphe ». (Fixation au Bouin-Duboscq-Brasil, coloration à l'hémalum-éosine, gross. 1 000 × env.)

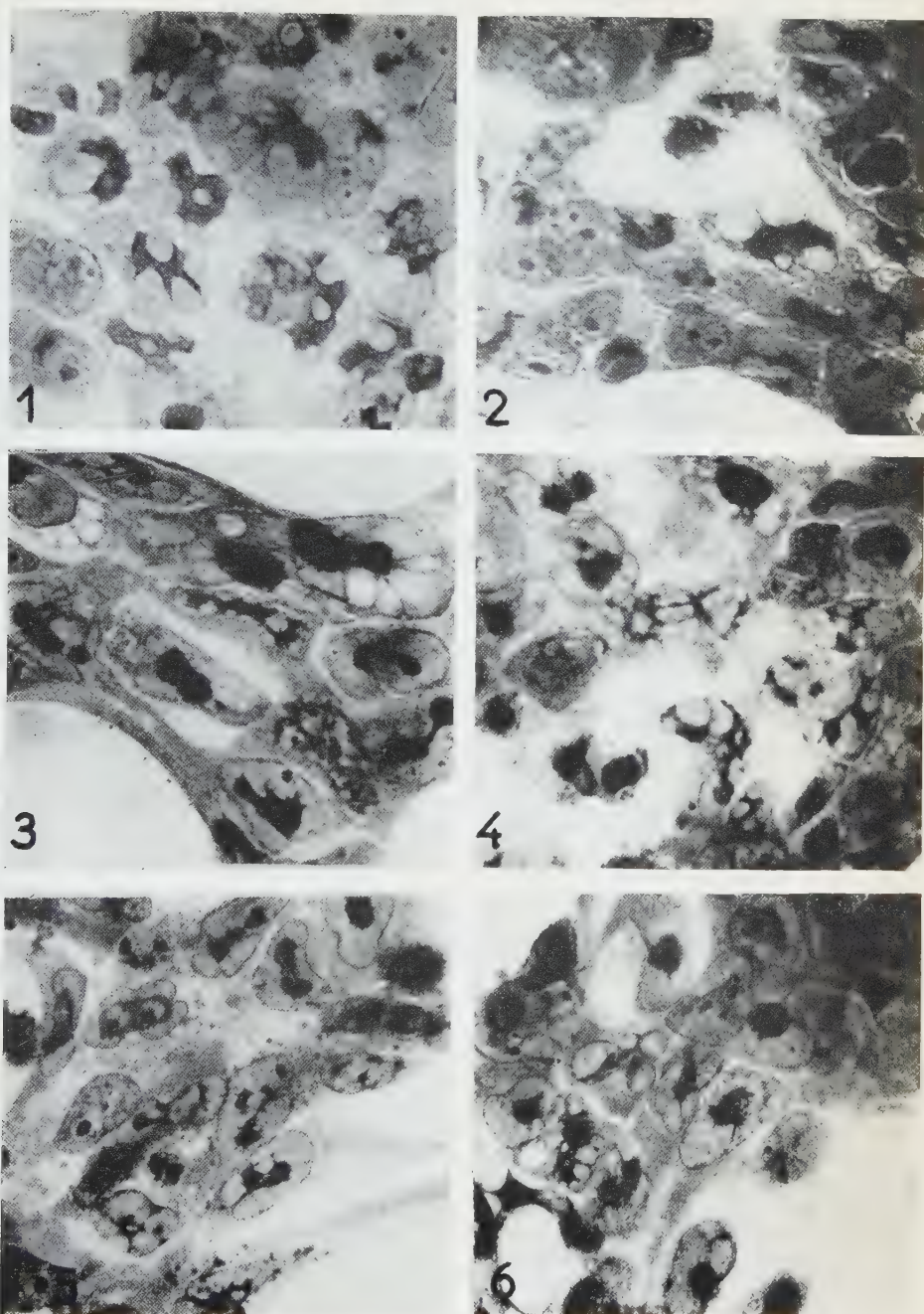


PLANCHE I.

PLANCHE II.

FIG. 7 à 10. — Cultures de la souche HeLa infectées depuis trois jours avec les adénovirus : (fig. 7) type 3, souche « Catlett » ; (fig. 8) type 3, souche « Blue » ; (fig. 9) type 4, souche « AI 67 » ; (fig. 10) type 7, souche « Gomen ». Dans tous ces cas on se trouve en présence de lésions nucléaires de type « compact ».

FIG. 11 et 12. — Cultures de la souche des fibroblastes testiculaires de lapin (H. Febyre) infectées avec les adénovirus de type 5, souche « Thomas M » (fig. 11) et de type 4, souche « RI 67 » (fig. 12). On remarque une vacuolisation intranucléaire et un polymorphisme marqué du corps d'inclusion, dans le premier cas, et des lésions compactes et peu vacuolaires dans le deuxième. (Fixation, coloration et gross. comme les fig. 1-10.)

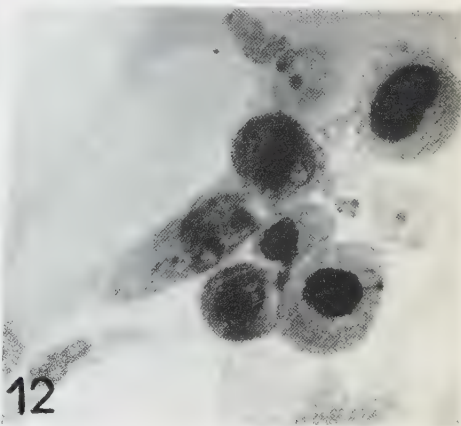
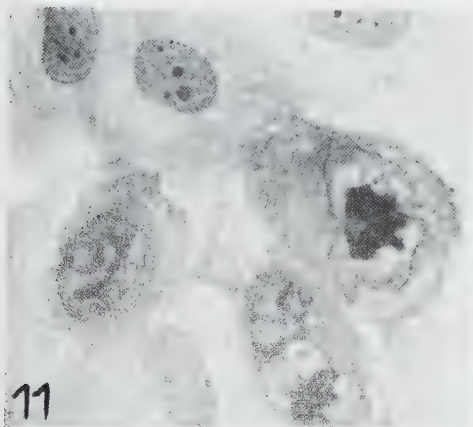
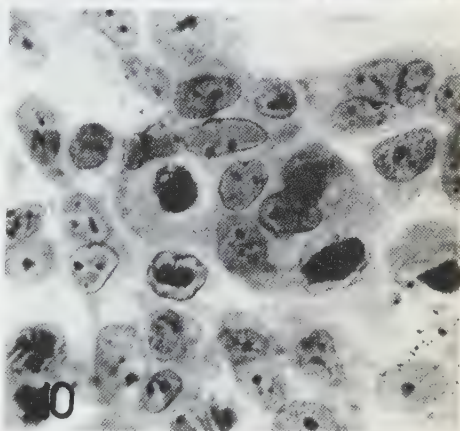
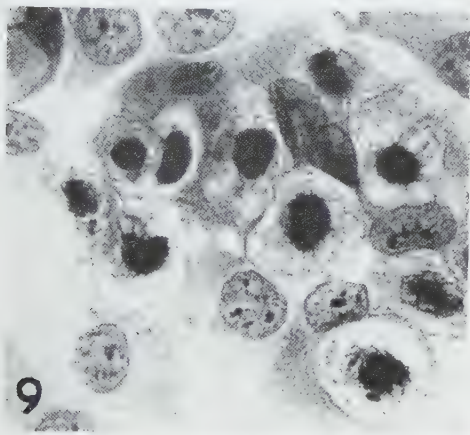
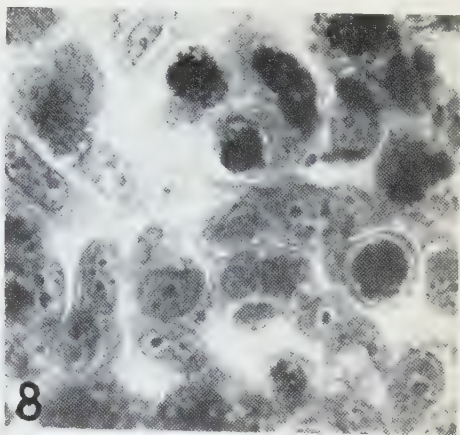
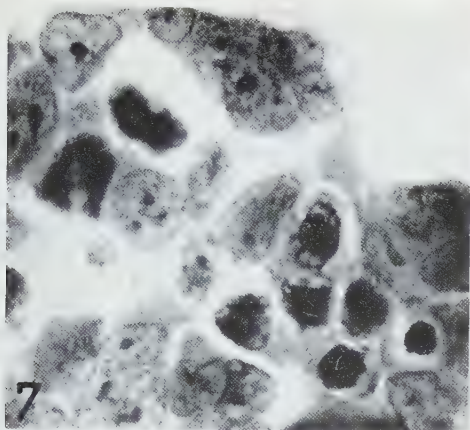


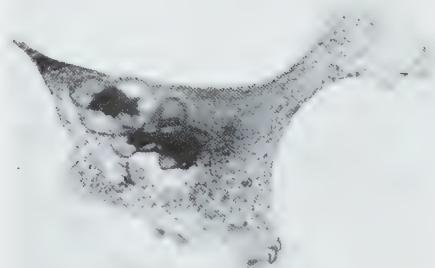
PLANCHE II.

PLANCHE III.

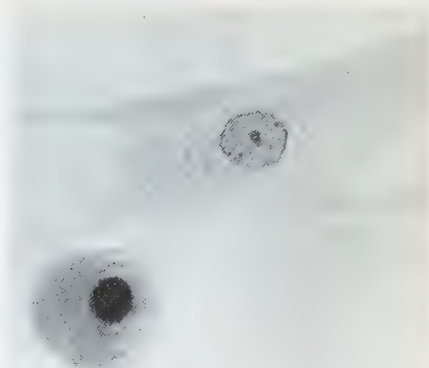
FIG. 13 et 14. — Cellules de la souche splénique du lapin (H. Fevre) infectées : 1° Avec l'adénovirus « Ad 75 » de type 5 (fig. 13) ; 2° Avec l'adénovirus RI 67 de type 4 (fig. 14). On remarque dans le premier cas une cellule binucléée avec membrane ondulante bien étalée et des lésions nucléaires spécifiques de type « vacuolaire » et, dans le deuxième cas, à côté d'une cellule normale, une autre, fortement rétractée avec une lésion nucléaire « compacte ». (Fixation, coloration et gross. comme les fig. 1-10.)

FIG. 15. — Cellules de la souche HeLa quarante-huit heures après infection avec l'adénovirus de type 1, souche « Ad 71 ». Un noyau normal à gauche et un autre à droite considérablement gonflé et boursoufflé, montrant de nombreuses agglomérations granuleuses (V) entourées de zones claires et représentant la lésion spécifique. Le cytoplasme est normal avec des mitochondries filamenteuses (M) en pleine activité. Culture vivante observée en chambre à perfusion au contraste de phase. (Gross. 3 500 $\times$ env.)

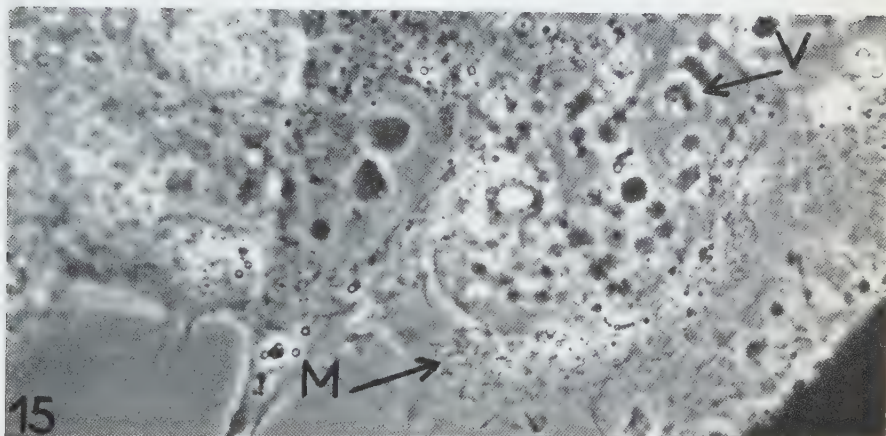
FIG. 16. — Culture parallèle à celle de la figure 15. Cellule normale à gauche et une autre à droite avec la lésion spécifique dont on distingue la structure granuleuse assez régulière. (Fixation d'après Bensley, coloration à l'hématoxyline de Harris. Gross. 3 500 $\times$ env.)



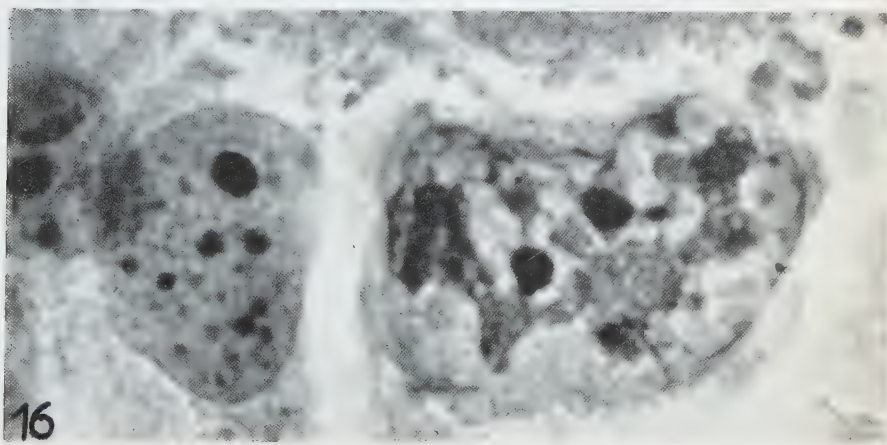
13



14



15



16

PLANCHE III.

PLANCHES IV et V.

Partie des noyaux des cellules HeLa, trois jours après infection avec l'adénovirus « Ad 71 » de type I. Fixation à l'acide osmique à 1 p. 100 d'après Palade (20 min.). Coupe ultra mince. Microscope électronique RCA. Fig. 17, gross. 30 000 $\times$ env. Fig. 18, gross. 35 000 $\times$ env. On remarque une polylobulation extrême du noyau avec apparition des espaces vacuolaires dans lesquels se déversent les particules virales dispersées (fig. 17) ou agglomérées en formes « cristallines » (fig. 18).

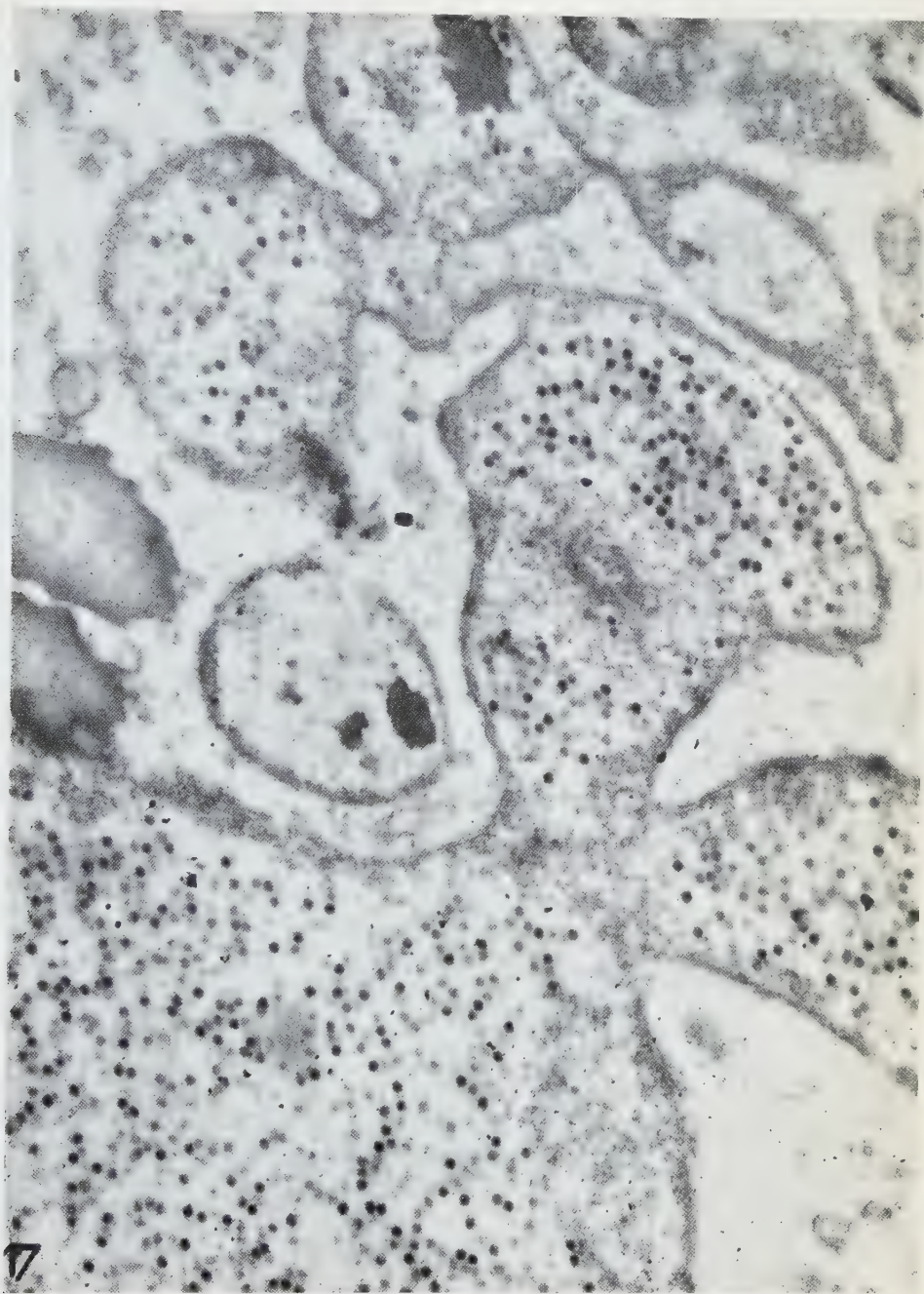


PLANCHE IV.

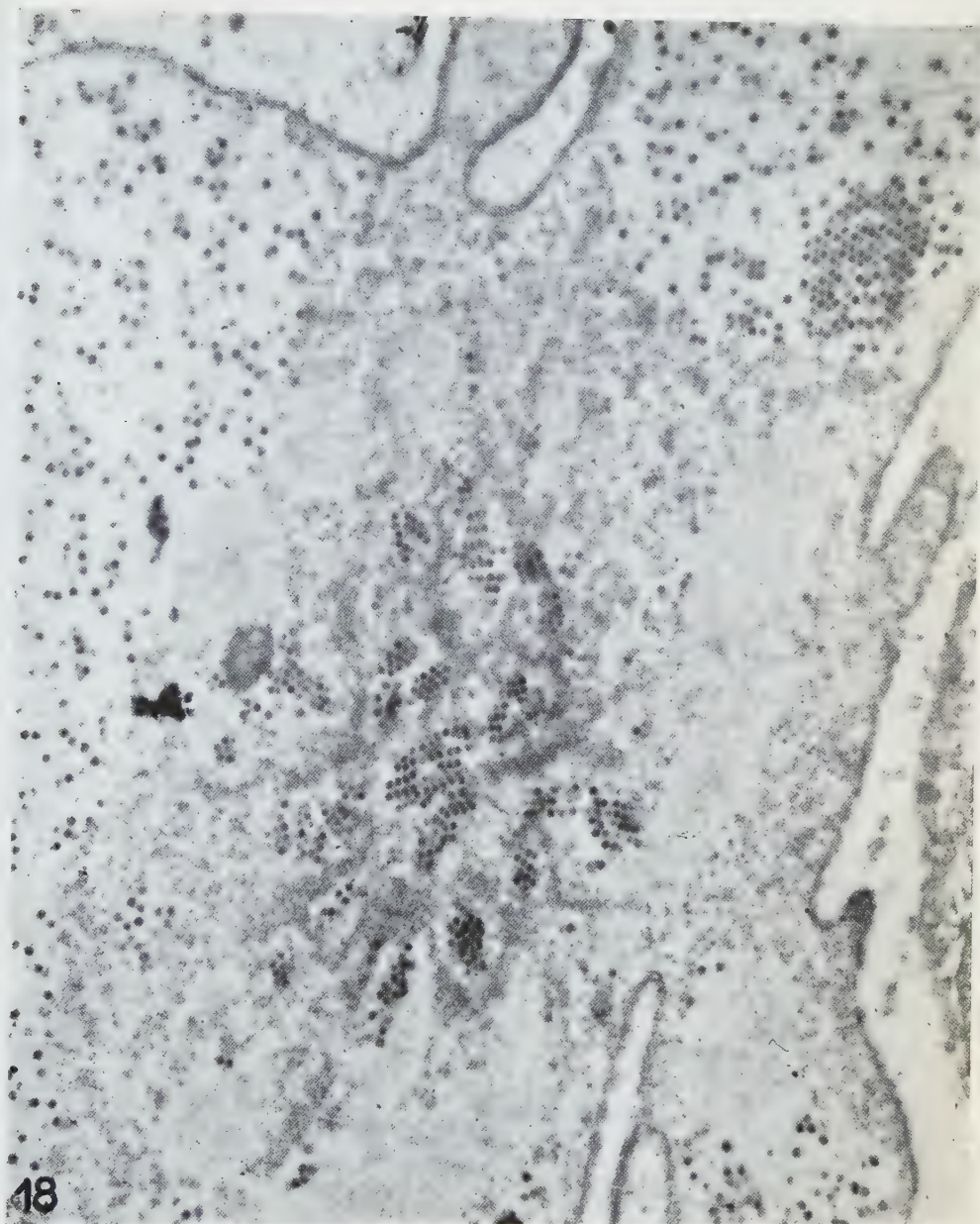


PLANCHE V.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

PLANCHE VI.

Noyau d'une cellule HeLa trois jours après infection avec l'adénovirus « RI 67 » de type 4. Conditions de fixation, d'observation et gross. comme fig. 18. On observe un noyau relativement peu altéré avec, au centre, un corps d'inclusion rempli de particules de virus en arrangement cristallin.

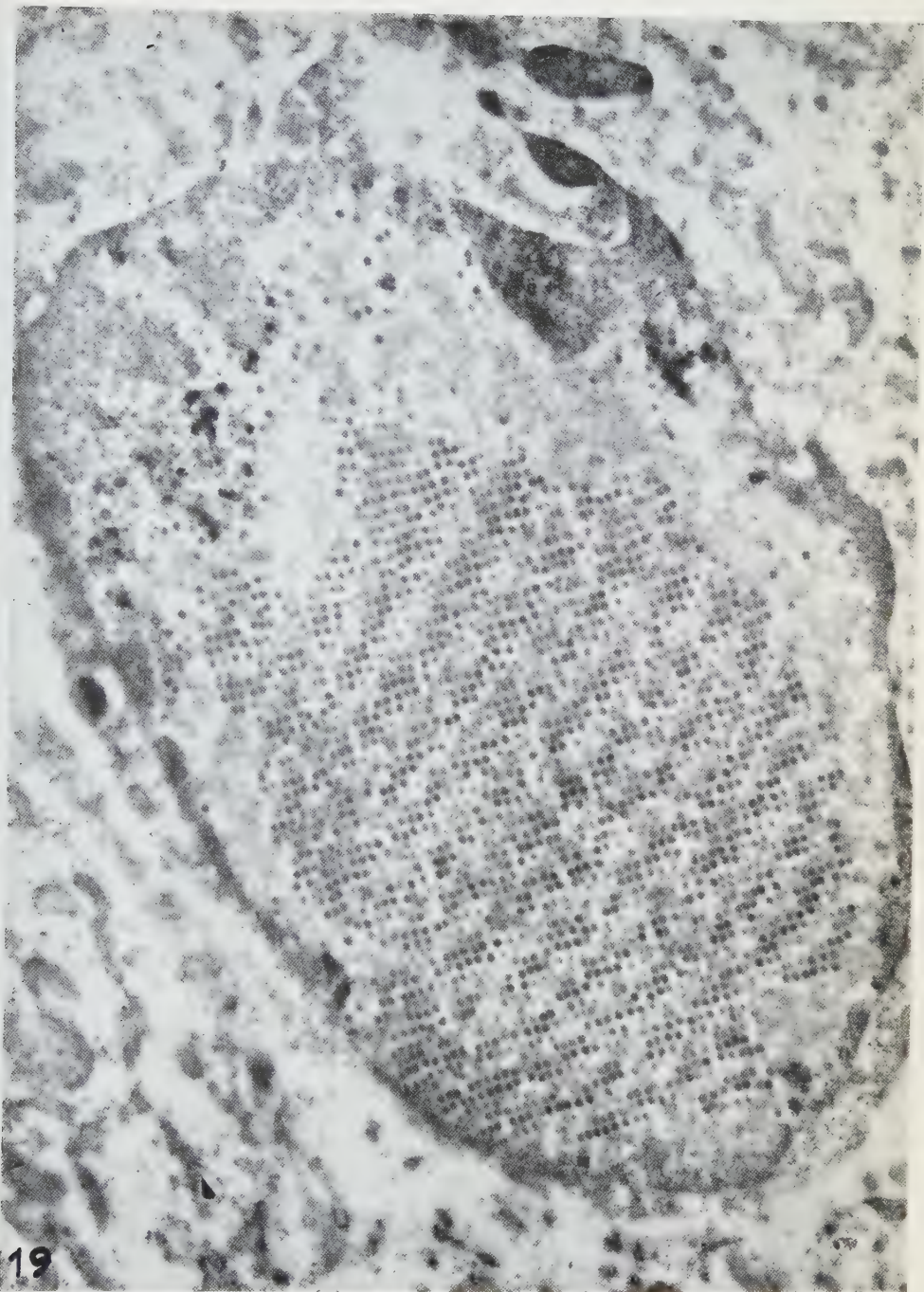


PLANCHE VI.

manentes au cours des passages successifs. Elles ont été également remarquées par d'autres auteurs [5, 6].

Il est significatif qu'on arrive à retrouver des différences analogues en inoculant les mêmes virus dans des cultures cellulaires aussi éloignées des cellules HeLa que le sont par exemple les fibroblastes testiculaires de lapin.

Il faut toutefois souligner que l'intense vacuolisation nucléaire et le polymorphisme du corps d'inclusion qui caractérisent des lésions de type 1, 2 et 5 d'adénovirus, ne sont, par leur nature, qu'une exagération extrême et généralisée d'un phénomène rencontré, mais en germe seulement, avec d'autres types d'adénovirus. Des formes de passage peuvent d'ailleurs être observées dans les deux groupes d'adénovirus.

L'emploi des fixateurs courants, tels que le Bouin ou le Carnoy, favorise la mise en évidence de l'élargissement, de la vacuolisation et de la déformation nucléaire propres aux types d'adénovirus 1, 2 et 5. Mais nous retrouvons des lésions correspondantes également sur cultures vivantes ainsi que sur cellules fixées à l'acide osmique et observées au microscope électronique (pl. III, fig. 15 et 16 ; pl. IV, fig. 17, et pl. V, fig. 18).

Ainsi, d'après nos observations concernant 20 souches d'adénovirus, il semble possible de les classer, d'après leur comportement en culture cellulaire : 1° *en souches à « lésions nucléaires vacuolaires et polymorphes »*, 2° *en souches à « lésions nucléaires compactes »*.

Si à la première catégorie appartiennent les 14 souches de type 1, 2 et 5 examinées par nous, nous avons pu classer d'après les mêmes critères dans la deuxième catégorie les 6 souches de type 3, 4 et 7 que nous avions à notre disposition.

Ce classement est d'autant plus suggestif qu'il coïncide avec la division de l'ensemble du groupe des adénovirus en virus à infection de prédominance latente et asymptomatique englobant les types 1, 2 et 5, et en virus de type 3, 4 et 7 se manifestant plus fréquemment par des infections aiguës, d'allure épidémique [1, 2, 3].

Il est difficile, actuellement, de se prononcer entièrement sur la nature et la signification des phénomènes qu'on observe dans les noyaux des cellules infectées avec les adénovirus. Il devient d'autant plus difficile d'expliquer le rapport entre certains aspects particuliers de ces lésions et les caractères pathogènes des souches virales correspondantes chez l'homme.

On peut rappeler à ce propos l'exemple de la rage où pareillement un certain parallélisme peut exister entre le caractère biologique d'une souche virale et l'aspect des lésions cellulaires induites par cette souche, qui se manifeste par une abondance plus ou moins grande des corps de Negri [10].

Nous pouvons conclure que, malgré l'inconnue qui persiste en ce qui concerne la signification biologique de la diversité dans l'aspect des lésions cellulaires à l'intérieur du groupe d'adénovirus, ces différences apparaissent, à côté des réactions sérologiques, comme un nouveau moyen de reconnaissance et de classification des souches virales de ce groupe.

SUMMARY

DISTINGUISHING ASPECTS OF CELLULAR LESIONS
PRODUCED *in vitro* BY DIFFERENT ADENOVIRUS TYPES.
A STUDY OF 20 STRAINS OF 6 ADENOVIRUS TYPES.

Our previous observations on differences in cellular lesion patterns peculiar to some adenovirus strains as demonstrated in *in vitro* cultivated HeLa cells are now confirmed in a study dealing with 20 different adenovirus strains belonging to types 1, 2, 3, 4, 5 and 7.

One common appearance of the cellular lesion has been observed for all types 1, 2 and 5 strains used, and one other typical of all types 3, 4 and 7 strains available in this study. Intermediary aspects can be seen in each of both groups.

The type 1, 2 and 5 pattern is characterized by a highly vacuolar nuclear lesion with a polymorphic inclusion body, whereas types 3, 4 and 7 strains exhibit rather less intense nuclear vacuolization with a compact, uniform and centrally located nuclear inclusion body. The retraction of individual cells, but not of cell layers, is more accentuated in the second group lesions.

These specific aspects appear permanent for each adenovirus strain studied during subsequent passages. They could also be demonstrated in cultures of cells other than HeLa, such as rabbit fibroblasts. The currently used fixatives emphasize the nuclear vacuolization and distortion seen in virus-infected cells, although these phenomena can be seen also in living cells by phase contrast microscopy as well as on osmic acid fixed cells observed in the electron microscope.

A possible relation between, on the one hand the accepted grouping of the adenoviruses according to their serological type or their pathological potentialities, and on the other hand their pattern of *in vitro* induced cellular lesions, is considered and discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HILLEMANN (M. R.), WERNER (J. H.) et STEWART (M. T.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **90**, 555.
- [2] ROWE (W. P.), HUEBNER (R. J.), HARTLEY (J. W.), WARD (T. G.) et PARROTT (R. H.). *Am. J. Hyg.*, 1955, **64**, 197.

- [3] BELL (J. A.), ROWE (W. P.), ENGLER (J. I.), PARROTT (R. H.) et HUEBNER (R. J.). *J. am. med. Assoc.*, 1955, **157**, 1083.
 - [4] BARSKI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 614.
 - [5] BOYER (G. S.), LEUCHTENBERGER (C.) et GINSBERG (H. S.). *J. exp. Med.*, 1957, **105**, 195.
 - [6] GINSBERG (H. S.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, **67**, 383.
 - [7] BARSKI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 512.
 - [8] BARSKI (G.) et ROBINEAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 514.
 - [9] BERNHARD (W.). In *Les techniques récentes en microscopie électronique et corpusculaire*, Toulouse, 1955, p. 163.
 - [10] MORGAN (C.), HOWE (C.), ROSE (H. M.) et MOORE (D. M.). *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1956, **2**, 351.
 - [11] LÉPINE (P.). *Rage* in *Les ultravirus des maladies humaines*, Levaditi (C.) et Lépine (P.), Paris, 1948, Maloine, édit., p. 340.
-

IMMUNO-ÉLECTROPHORÈSE APPLIQUÉE AU VIRUS APHTEUX

par M.-Th. FAYET et G. PONCET (*).

(Laboratoire de Recherches Vétérinaires, Lyon)

L'immuno-électrophorèse mise au point par Grabar et Williams (1) [1] permet, à la suite d'une électrophorèse, de mettre en évidence un antigène par précipitation avec l'anticorps correspondant, les deux opérations d'électrophorèse et de précipitation spécifique se poursuivant en milieu gélifié.

Or, l'électrophorèse du virus aphteux a été étudiée par de nombreux chercheurs ; les résultats obtenus ont été résumés par Hirtz [2] qui a apporté une contribution personnelle à cette étude. Que ce soit par électrophorèse de frontière [3] ou par électrophorèse de zone [4] dans l'amidon, les auteurs ont cherché, jusqu'ici, à obtenir des fractions séparées et à mesurer, pour chacune d'elles, infectivité et fixation du complément. La méthode d'immuno-électrophorèse permet de révéler le virus aphteux après migration électrophorétique en utilisant une autre propriété : sa qualité d'antigène précipitant. En effet, la réaction de précipitation double en milieu gélifié a été appliquée avec succès au virus aphteux [5, 6, 7, 8, 9, 10] selon la technique d'Ouchterlony [11].

Il était donc tentant d'étudier les possibilités données par l'immuno-électrophorèse, combinaison de ces deux techniques de pratique courante dans notre laboratoire.

I. — MATÉRIEL.

1° ANTIGÈNES. — Les liquides virulents utilisés comme antigènes ont été :

a) La lymphe aphteuse bovine récoltée sur des aphtes linguaux non rupturés d'animaux inoculés de virus aphteux des trois type O, A, C ;

(*) Manuscrit reçu le 6 février 1958.

(1) Nous remercions M. le professeur P. Grabar de l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire et des conseils précieux qu'il a bien voulu nous prodiguer ensuite.

b) Du virus extrait de cette lymphé aphteuse par ultracentrifugation (Bradish et coll. [12]) ;

c) Du virus préparé par broyat d'épithélium aphteux de bovin conservé à -40° et repris par du tampon phosphate (pH 7,6, μ 0,15) ;

d) Ce même virus d'aphte, concentré ensuite par dialyse contre une solution de subtosan ;

e) Du liquide virulent préparé selon la technique de Frenkel [13] concentré soit par dialyse contre du subtosan, soit par ultracentrifugation.

2° SÉRUMS. — Les sérums utilisés ont été :

a) Sérums hyperimmuns anti-O, anti-A, anti-C de bovins ou de cobayes ;

b) Sérums trivalents anti-O-A-C obtenus en rechargeant avec un mélange des trois types de virus, deux fois par mois, une série d'animaux préalablement vaccinés ;

c) Sérums témoins : sérum normal prélevé sur animaux indemnes de fièvre aphteuse et sérum anti-épithélium lingual normal [9].

II. — TECHNIQUE.

Nous avons adopté une méthode dérivée à la fois de celle de Grabar et Williams [4] et celle de Scheideger [14], celle-ci étant une adaptation de la première à de petites quantités de réactifs.

La gélose est préparée avec de l'agar-agar Merck selon la technique indiquée par Grabar. En partant de gélose à 3 p. 100, elle est ensuite diluée de moitié avec le tampon choisi. La plupart des expériences ont été faites avec le tampon véronal de pH 8,2 et de force ionique 0,1.

La gélose est coulée sur des lames de microscope ($7,5 \times 2,5$ cm) à raison de 3,5 ml par lame. Après refroidissement, on découpe à l'emporte-pièce, au centre, une cupule de 3 mm de diamètre, et on fait pour chaque rigole destinée à recevoir le sérum deux fentes parallèles distantes de 2,5 mm environ (pl. fig. 1). Les lames sont placées sur une plaque de verre de 60 cm qui s'appuie sur les cuves d'électrophorèse et elles sont soudées entre elles avec un peu de gélose (fig. 1). La cupule de départ est remplie une première fois d'antigène et, après diffusion du liquide, remplie d'un mélange à volumes égaux d'antigène et de gélose à 3 p. 100 fondue ; ce mélange est fait au bain-marie à 46° .

L'électrophorèse est pratiquée sur deux séries parallèles de 8 lames chacune. Les cuves sont en plexiglass et les électrodes en fils de platine. La jonction entre les lames recouvertes de

gélose et le tampon des cuves d'électrophorèse est assurée par un papier filtre épais imprégné de tampon et soudé aux lames par de la gélose (fig. 1). L'électrophorèse est effectuée sous une tension de 5 à 6 volts/cm avec une intensité de 7 à 8 mA par série, pendant une heure et demie environ, à température ordinaire. Pour éviter la dessiccation, on fixe à la silicone, sur les bords de la plaque de verre supportant les lames, deux baguettes

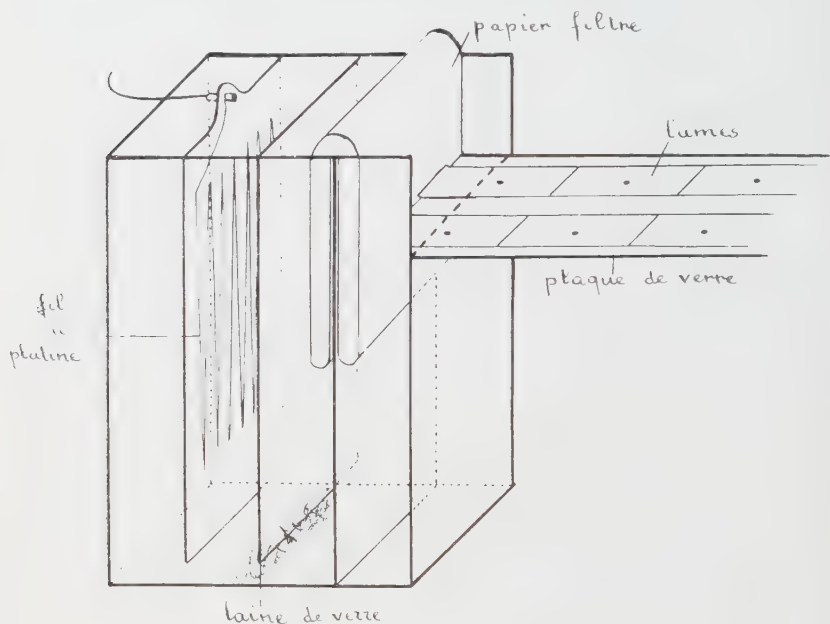


FIG. 1. — Schéma de l'appareil.

de plexiglass de $60 \times 1 \times 1$ cm qui soutiennent une feuille de polyvinyl, celle-ci recouvrant ainsi les lames sans les toucher.

Après l'électrophorèse, les rigoles sont débarrassées de la gélose et remplies du sérum choisi. La réaction de précipitation se poursuit en chambre humide à 37° pendant au moins cinq jours ; mais les lignes sont déjà visibles après vingt heures.

Les lames peuvent être photographiées ; il suffit pour cela de les placer sous une couche de sérum physiologique, dans une boîte de Petri qui repose elle-même sur le papier photographique (Lugda extra-dur). D'après les techniques indiquées par Uriel et Grabar [15], les lames suffisamment lavées et desséchées peuvent être colorées et photographiées à nouveau en les plaçant

sous le liquide qui a servi au rinçage de la coloration. Elles peuvent ensuite être conservées en décollant de la lame de verre la couche de gélose sèche.

III. — EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS.

Par immuno-électrophorèse d'un virus aphteux dont le titre est suffisamment élevé, en présence de sérum hyperimmun correspondant, de bœuf ou de cobaye, on obtient en général une ligne de précipitation (pl. fig. 1). Cette réaction a été réalisée avec des résultats positifs pour chacun des trois types de virus. En pratiquant dans les mêmes conditions une électrophorèse de sérum dont on trace la courbe par colorimétrie, on constate que le composant antigénique qui a provoqué l'apparition de la ligne de précipitation a sensiblement la même mobilité que les β -globulines (pl. fig. 1).

C'est ainsi que la lymphe aphteuse de chaque type donne presque toujours une ligne nette, lorsque le sérum hyperimmun correspondant est utilisé pur, au demi ou au quart. Le virus préparé à partir d'aphtes et le virus Frenkel ne réagissent que s'ils sont suffisamment concentrés.

Quelquefois, avec le type O en particulier, la ligne de précipitation revêt une allure dissymétrique et présente deux centres de courbure. Dans plusieurs cas, il y a eu formation de deux lignes de précipitation (pl. fig. 2). Cette deuxième ligne apparaît surtout lorsqu'on a pu extraire et concentrer les anticorps du sérum précipitant. Elle se trouve alors située entre l'antigène et la ligne habituellement formée. La présence de ces deux lignes laisse supposer l'existence de deux composants. Il semble que la mobilité du deuxième composant soit alors légèrement plus grande que celle du premier (pl. fig. 2).

D'autre part, ayant procédé au fractionnement du virus aphteux par ultracentrifugation (Bradish et coll., {12}), nous l'avons séparé en deux constituants : l'un infectieux et déviant le complément (gros composant), l'autre presque exclusivement fixateur du complément (petit composant). L'électrophorèse du gros composant et la diffusion en présence de sérum de même type donne une ligne de précipitation en général plus nette que celle obtenus avec la lymphe de départ, et quelquefois une deuxième ligne est visible. Cette réaction a été réalisée également avec les trois types de virus. Le petit composant concentré à partir du surnageant initial par une ultracentrifugation très poussée (cinq heures trente à 110 000 g) donne aussi une ligne de précipitation nette.

A côté de ces réactions spécifiques de type, il apparaît, de

façon irrégulière, des réactions croisées toujours très faibles. C'est ainsi que nous avons pu observer quelquefois une ligne de précipitation entre le virus O soumis à l'électrophorèse et le sérum A ou C, entre le virus A et le sérum O, entre le virus C et le sérum O.

Les lignes hétérologues précédentes sont trop faibles pour qu'on puisse observer exactement si la vitesse de migration électrophorétique des trois types de virus est la même. Mais en faisant l'immuno-électrophorèse avec les trois types de virus en présence du même sérum trivalent, qui réagit par conséquent avec les trois antigènes, on constate que la vitesse électrophorétique des trois types de virus est sensiblement la même.

Aucune ligne de précipitation ne s'est formée avec les sérums normaux d'animaux non infectés ni avec le sérum anti-épithélium lingual normal, quelle que soit la solution virulente utilisée comme antigène.

IV. — DISCUSSION.

Bien que, dans l'ensemble, l'électrophorèse en gélose ne permette pas encore de mesurer avec précision la mobilité électrophorétique d'un composant, l'immuno-électrophorèse, utilisant la propriété de précipitation du virus aphteux, révèle une mobilité voisine de celle des β -globulines. Ce résultat est conforme aux données trouvées par électrophorèse de frontière ou de zone dans lesquelles le virus est ensuite mis en évidence par mesure d'infectivité ou de fixation du complément [2, 3, 4].

L'apparition de deux lignes de précipitation dont le centre de courbure ne paraît pas identique, ou la formation d'une ligne à deux centres de courbure au cours de l'immuno-électrophorèse, semble indiquer que le virus aphteux est formé au moins de deux composants. Il est assez logique de penser qu'il s'agit des deux composants que Bradish et coll. [12] ont mis en évidence par ultracentrifugation. Il semble bien que la ligne la plus habituellement obtenue est due à la petite particule. Cette ligne apparaît dans tous les cas, que le liquide utilisé comme antigène mis en électrophorèse soit riche ou non en particules

LEGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — A. Courbe d'électrophorèse de sérum normal. — B. Electrophorèse de sérum normal. — C. Immuno-électrophorèse de virus aphteux. — D. Schéma d'une lame d'immuno-électrophorèse de virus aphteux.

FIG. 2. — A. Courbe d'électrophorèse de sérum normal. — B. Ligne à deux rayons de courbure. — C. Schéma de double ligne de précipitation.

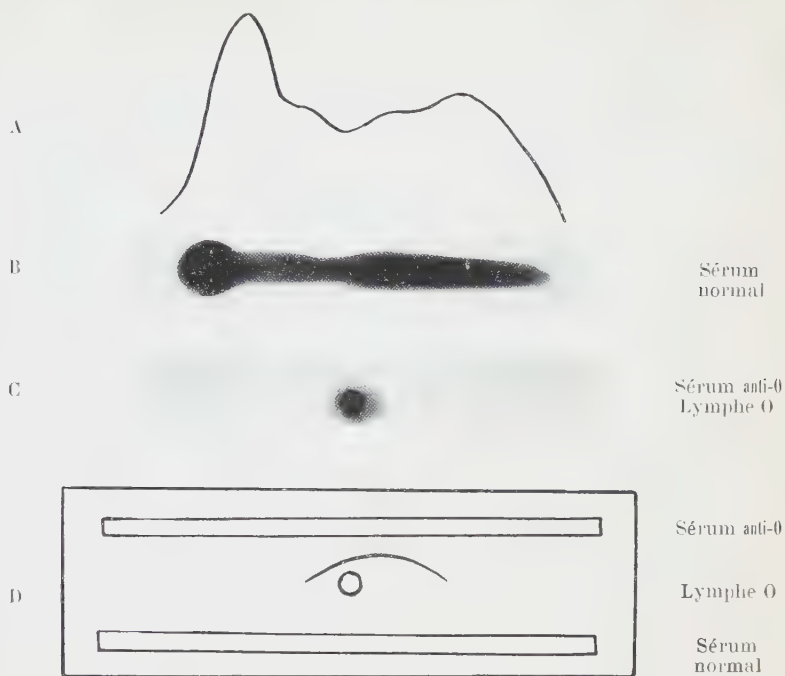


FIG. 1.

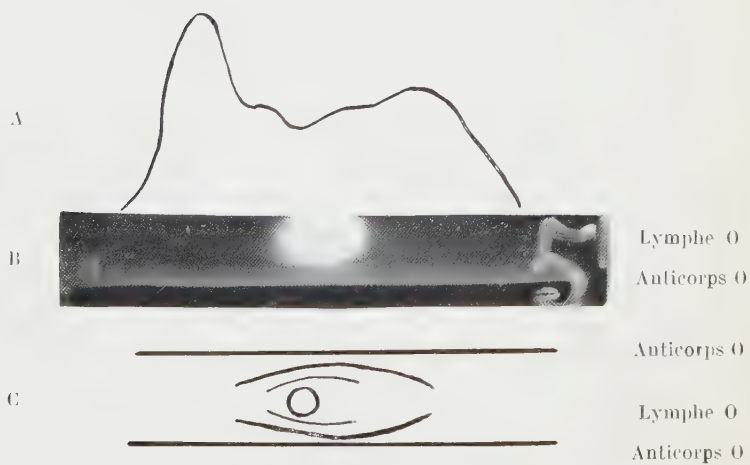


FIG. 2.



infectieuses. C'est ainsi que de la lymphe aphteuse rendue non infectieuse par chauffage de trente minutes à 56°, ou bien le petit composant concentré par ultracentrifugation, provoquent la formation de cette ligne de précipitation. Lorsque le liquide virulent initial est très infectieux, cette ligne apparaît aussi toujours comme la plus importante. Cela peut s'expliquer par le fait qu'au cours de l'électrophorèse, la plus grande partie des particules infectieuses sont dégradées par suite de l'élévation de température, et se transforment par conséquent en petites particules [17]. En effet, au cours de l'électrophorèse qui se poursuit à température ordinaire, le virus est légèrement chauffé par effet Joule. Ensuite, les plaques d'immuno-électrophorèse sont placées à l'étuve à 37°. Dans ces conditions de température, le nombre de particules infectieuses qui peuvent subsister est certainement faible.

Dans le cas où les particules infectieuses ont été au préalable concentrées par ultracentrifugation, le titre de l'antigène obtenu est en général supérieur d'une unité logarithmique à celui de la lymphe initiale (concentration $\times 10$). La quantité de virus est par conséquent plus importante, ce qui produit après dégradation un liquide riche en petites particules, d'où la netteté plus grande de la ligne habituelle, tandis que le nombre de particules infectieuses en survie est quelquefois suffisant pour permettre l'apparition de la deuxième ligne de précipitation.

D'autre part, la mobilité électrophorétique du composant infectieux serait ainsi légèrement supérieure, ce qui est en accord avec les travaux antérieurs [2, 4], qui signalent que le composant infectieux est plus rapide que le petit composant.

De la même façon, lorsque la ligne présente deux centres de courbure, il est probable que la partie de la ligne correspondant au composant le plus rapide est due à la particule infectieuse. La continuité de la ligne s'expliquerait dès lors par le fait de la parenté entre les deux particules, bien qu'il ne soit pas absolument prouvé que les petites particules provenant de la particule infectieuse soient exactement identiques à celles présentes initialement dans le virus [17].

Des études actuellement en cours nous permettront peut-être d'étayer l'hypothèse de la correspondance entre les deux lignes de précipitation obtenues et les deux composants habituellement considérés.

L'immuno-électrophorèse du virus aphteux est devenue de pratique courante dans notre laboratoire, et il est intéressant de souligner que cette technique encore nouvelle étend son champ d'application déjà très vaste (Scheidegger [16]) au domaine de la virologie.

SUMMARY

IMMUNO-ELECTROPHORESIS OF FOOT-AND-MOUTH VIRUS.

The study has been carried out with bovine virus and bovine or guinea-pig hyperimmune sera.

The technique used is described.

Immuno-electrophoresis of foot-and-mouth virus induces the formation of one or two precipitin lines, which correspond to constituents possessing the same mobility as β -globulins.

The hypothesis is discussed following which these lines would correspond to two constituents: one infectious and complement fixing (big constituent), the other complement fixing (small constituent).

★
★★

Les auteurs remercient leurs collègues de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse et du Laboratoire de Recherches Vétérinaires qui ont bien voulu leur procurer le matériel nécessaire et procéder aux mesures d'infectivité.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1955, **17**, 67.
- [2] HIRTZ (J.). *Archiv ges. Virusf.*, 1955, **6**, 124.
- [3] GIRARD (H.), MACKOWIAK (C.), HIRTZ (J.) et CAMAND (R.). *Rev. Immunol.*, 1953, **17**, 239.
- [4] HIRTZ (J.) et CAMAND (R.). *Rev. Immunol.*, 1954, **18**, 206.
- [5] BODON (L.). *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 1955, **5**, 157.
- [6] BODON (L.). *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 1956, **6**, 211.
- [7] MOOSBRUGER (G. A.), SPUCKLER (V.) et MEYER (K.). Communication FAO, Paris, 13 au 17 février 1956.
- [8] BROWN (F.) et CRICK (J.). *Nature*, 1957, **179**, 316.
- [9] MACKOWIAK (C.), FAYET (M.-Th.) et CAMAND (R.). *Rev. Immunol.*, 1957, **21**, 271.
- [10] VERGE (J.), DHENNIN (L.), DHENNIN (L.), FONTAINE (M.) et LARENAUDIE (B.). *Rev. Immunol.*, 1957, **21**, 260.
- [11] OUCHTERLONY (O.). *Thèse*, Stockholm, 1949.
- [12] BRADISH (C. J.), BROOKSBY (J. B.), DILLON (J. F.) et NOREMBUENA (M.). *Proc. Royal Soc. B.*, 1952, **140**, 107.
- [13] FRENKEL. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1953, **34**, 12.
- [14] SCHEIDEGGER (J. J.). *Int. Arch. Allergy*, 1955, **7**, 110.
- [15] URIEL (J.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 427.
- [16] SCHEIDEGGER (J. J.). *IV^{es} Journées Biochimiques Franco-Helvético-Hispano-Italiennes*, Montpellier, 13-16 mai 1957.
- [17] RANDRUP (A.). *Thèse*, Copenhague, 1957, E. Munksgaard, édit.

PHÉNOMÈNE D'AUTOSTÉRILISATION ET GUÉRISON DANS LA RAGE EXPÉRIMENTALE

par N. CONSTANTINESCO et N. BIRZU (*).

*(Institut D^r I. Cantacuzène. Filiale de Jassy ;
Institut d'Inframicrobiologie de l'Académie R. P. R.)*

C. Levaditi [14] a été le promoteur de la théorie des « neuro-infections mortelles autostérilisables », confirmée depuis 1928 dans maints chapitres de la pathologie infectieuse, tel celui de l'herpès [11, 15], de la poliomyélite [8, 9], de la maladie de Borna [20], de la rage [17, 18, 19], etc. D'après cette théorie, certaines névrites dues à des ultravirus neurotropes peuvent provoquer la mort de l'animal alors que le système nerveux a cessé d'être virulent. « Les altérations histopathologiques traduisent une réaction de défense, réussissent à neutraliser le germe, à masquer sa présence dans le tissu lésé, tout en provoquant des troubles morbides dont l'intensité est incompatible avec la vie » (Levaditi).

La rage est une maladie considérée comme étant toujours létale pour l'homme et pour les animaux. Cependant, il existe certaines espèces réfractaires ou partiellement résistantes, tels les oiseaux et les chauves-souris, qui font une maladie assez souvent récurrente, avec tendance naturelle à devenir chronique ou à guérir. Babes et Bobes [1, 2] avaient depuis longtemps montré que la rage peut évoluer, chez des chiens ou chez des chats, comme une infection intermittente, latente, chronique, quelquefois curable. Récemment, nous avons décrit la rage guérie chez des rats [5] et chez des souris [6, 7], vaccinés auparavant et paralysés à l'occasion de l'infection d'épreuve. A partir de 1943 [3], nous avons constaté chez l'homme ou chez des animaux vaccinés, morts de la rage, l'absence du virus rabique des rues dans les nerfs périphériques (septinévrite négative) et, en conséquence, l'absence des glandes salivaires (rage « fermée » [3, 21] (tableau I).

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 février 1958.

TABLEAU I.

RAGE PARALYTIQUE MORTELLE CHEZ	GLANDES SALIVAIRES AVIRULENTES (rage "fermée")	GLANDES SALIVAIRES VIRULENTES
Animaux non vaccinés	20 %	80 %
Animaux vaccinés	86 %	14 %
2 hommes non vaccinés	0	2 cas
5 hommes vaccinés	4 cas	1 cas

En 1955, nous avons montré [5], en même temps que Jelesic et Atanasiu [10], que le névraxe de certains animaux, vaccinés et morts de rage paralytique à la suite de l'infection d'épreuve, ne contient plus de virus rabique, réalisant ainsi le phénomène d'autostérilisation mortelle de Levaditi. Dans des notes préliminaires [6, 7], nous avons précisé les conditions dans lesquelles est réalisé ce phénomène, en avons suggéré les applications éventuelles à la rage humaine.

A. — VIRULENCE COMPARATIVE DU CERVEAU
CHEZ DES SOURIS VACCINÉES OU NON VACCINÉES,
ATTEINTES DE PARALYSIE RABIQUE.

Pour l'immunisation des souris nous avons comparé entre eux différents vaccins antirabiques :

a) Un « vaccin phéniqué tué », suspension de tissu nerveux de mouton à 5 p. 100, phéniquée à 1 p. 100, chauffée pendant trois jours à 37° et ensuite conservée à 4° C ; b) Le « vaccin de Fermi classique », conservé à 4° pendant trente jours, devenu non rabigène par voie cérébrale ; c) un « vaccin phéniqué atténué vivant » préparé dans les mêmes conditions que les précédents, mais administré frais lorsqu'il était encore virulent ($DL_{50} = 10^{-2,7}$) pour le cerveau de la souris.

L'administration des vaccins, l'infection cérébrale d'épreuve et le titrage de la virulence du cerveau en DL_{50} ont été effectués d'après les techniques usuelles.

TABLEAU II.

ANIMAUX VACCINÉS					ANIMAUX TÉMOINS			
LOTS DES SOURIS : N°1		N°2	N°3	N°4	N°1	N°2	N°3	N°4
Expérience I	10 ⁴	10 ³	10 ²	10DL50	10 ²	10 ¹	1	0,1DL50
Expérience II	5.10 ⁴	5.10 ³	5.10 ²	50DL50	5.10 ²	50	5	0,5DL50
Expérience III	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ² DL50	10 ³	10 ²	10	10DL50

1° *Infection d'épreuve avec du virus rabique fixe.* — Les souris de trois séries d'expériences ont reçu, par voie cérébrale, les doses suivantes de virus fixe « Babes » en DL50 (tableau II).

a) *Capacité immunogène comparative des vaccins.* — A la suite de la vaccination préventive et à l'occasion de l'infection cérébrale d'épreuve, certaines souris se sont montrées complètement réfractaires (immunité absolue). D'autres souris ont fait une encéphalite rabique avec une phase paralytique prolongée, la survie des animaux dépassant plus de dix jours (immunité partielle) :

Vaccin phéniqué tué :		
160 souris paralysées,	dont 8,1 % survivant plus de 10 jours	
Vaccin de Fermi :		
93 souris paralysées,	dont 41,9 % survivant plus de 10 jours	
Vaccin phéniqué vivant :		
39 souris paralysées,	dont 64,5 % survivant plus de 10 jours	
Souris témoins :		
192 souris paralysées,	dont 2 % survivant plus de 10 jours	

Certains des animaux ont fait une « rage paralytique guérie », caractérisée par des séquelles neuro-musculaires, avec impotence fonctionnelle, comparables à celles de la poliomyélite humaine.

La proportion des souris immunisées réfractaires, survivant plus de dix jours (dont le névraxe est devenu non virulent), ou « guéries » a varié d'après l'efficacité du vaccin et l'intensité de l'infection d'épreuve (tableau III).

TABLEAU III.

VACCINS ADMINISTRÉS	EXPÉRIENCE I		EXPÉRIENCE II		EXPÉRIENCE III	
	Souris vaccinées	Souris immunisées	Souris vaccinées	Souris immunisées	Souris vaccinées	Souris immunisées
Phéniqué tué	47	13 (27%)	56	7 (12%)	69	0
Fermi	59	51 (86%)	—	—	71	25 (35%)
Phéniqué vivant	—	—	49	34 (69%)	—	—
TÉMOINS	infectées 62	résistantes 4 (6%)	infectées 72	résistantes 3 (4%)	infectées 65	résistantes 0

b) *Processus d'autostérilisation.* — La fréquence de l'autostérilisation du cerveau dépend de l'efficacité du vaccin administré (tableau IV).

Chez les souris témoins, ainsi que chez les souris traitées avec du vaccin phéniqué tué, dont l'encéphalite rabique a évolué entre le quatrième et le neuvième jour après l'infection cérébrale d'épreuve, la virulence a varié entre DL50 $10^{-6,5}$ (titre non plafonné) et DL50 $10^{-11,3}$. Ce dernier chiffre, si élevé, jamais enregistré chez le lapin (dont le cerveau n'atteint qu'une moyenne de

TABLEAU IV.

SURVIE (jours)	INCLUBATION (jours)	PHASE PARALYTIQ. (jours)	TITRE DE LA VIRULENCE DU CERVEAU DES SOURIS EN DL50, DANS LA PHASE TERMINALE DE LA RAGE.			
			SOURIS NON VACCINÉES	VACCIN PHÉNIQUÉ TUÉ	VACCIN DE FERMI CLASSIQUE	VACCIN PHÉNIQUÉ VIVANT
5-7	4-5	1-2	10-7,5	-	-	-
			10-7,5	-	-	-
			10-8,7	10-11,3	10-7,5	-
			>10-6,5	>10-6,5	10-7,4	-
8-9	5-8	1-3	10-11,3	10-10,8	10-9,5	10-5,5
			10-9,7	>10-9,5	10-5,3	10-5,0
			10-8,5	10-8,9	10-5,2	10-4,9
			10-8,4	10-8,5	10-4,0	-
			10-10,2	>10-8,4	10-3,0	-
			10-9,2	>10-8,4	0	-
			>10-6,5	10-7,2	-	-
			>10-6,5	10-6,8	-	-
			-	-	-	-
10	5-8	2-5	>10-9,5	>10-9,5	0	10-4,2
			>10-6,5	>10-6,5	0	10-3,0
			>10-6,5	>10-6,5	0	10-2,9
			-	>10-6,5	0	10-2,9
			-	>10-6,5	0	10-1,9
11-13	6-12	1-7	10-8,5	10-7,3	10-5,3	<10-1
			- *	10-1,8	10-2,3	<10-1
			-	<10-1,0	00	<10-1
			-	000	00	00000000
			-	-	000	00000000
14-16	9-13	1-5	>10-11,5	0	0000	000000
18-25	11-19	6-14	-	-	10-5,0	000
			-	-	000	00
27-28	6-9	18-21	-	-	-	00000

* Les souris témoins sont mortes, sauf deux exceptions, au cours des dix premiers jours. O, cerveau non virulent (DL50 = 0).

DL50 $10^{-6,5}$), traduit l'exacerbation du virus à la suite des passages sur des muridés, tel que nous l'avons décrit antérieurement [22].

Lorsque l'animal vacciné atteint et dépasse la survie de dix jours après l'infection cérébrale d'épreuve, la capacité virulicide du névraxe est intense : l'autostérilisation a été totale (DL50 = 0) chez 19 souris sur 30 (63 p. 100) et chez 30 souris sur 41 (73 p. 100) dans le cas des vaccins actifs (Fermi et vaccin phéniqué vivant), par opposition aux souris du groupe traité par le vaccin phéniqué tué, dont le cerveau a été trouvé non virulent chez 4 d'entre elles seulement sur 22 (18 p. 100).

Le processus d'autostérilisation n'est aucunement conditionné par la dose infectante d'épreuve reçue par l'animal. L'organisme a détruit le virus rabique, dans le cas des vaccins actifs, même lorsque les souris avaient reçu des doses massives de virus fixe, soit 10^4 à 10^5 DL50 par voie cérébrale. D'autre part, une virulence très élevée (DL50 = 10^{-6} à 10^{-10}) a été constatée

dans le cerveau des souris ayant reçu seulement 10 à 10^2 DL₅₀ de virus fixe, mais qui avaient été vaccinés avec du vaccin phéniqué tué (fig. 1).

2° *Infection d'épreuve avec du virus rabique des rues.* — Les souris vaccinées avec du vaccin de Fermi ont été éprouvées par voie cérébrale, quarante-huit heures après la dernière dose, avec une suspension 1/10 de cerveau d'un sujet humain ayant succombé à la rage, titrant $DL_{50} = 10^{4,0}$ (expérience A). D'autres souris vaccinées ont reçu vingt-cinq jours plus tard, et également par voie cérébrale, la même souche, passée une seule fois par le cerveau de la souris, titrant $DL_{50} = 10^{-4,2}$ (expérience B).

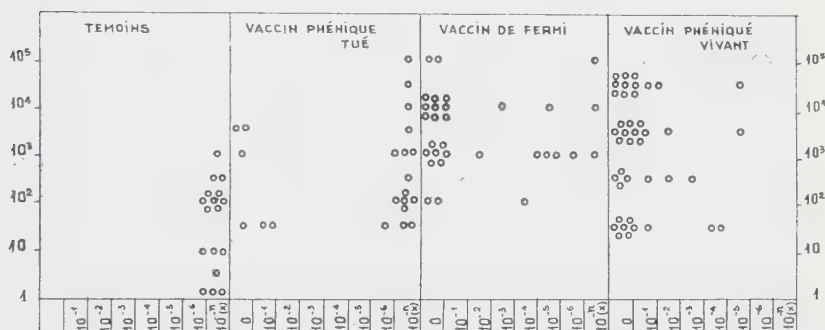


FIG. 1. — En abscisse, virulence du cerveau (DL₅₀). En ordonnée, infection cérébrale avec du virus fixe (DL₅₀). * DL₅₀ 10⁻⁷.

Les proportions des souris immunisées (réfractaires ou paralysées avec autostérilisation totale) ont été les suivantes :

Expérience A :

47 souris témoins, aucune survie 0
46 souris vaccinées, dont 30 immunisées 65 %

Expérience B :

41 souris témoins, aucune survie 0
34 souris vaccinées, dont 37 immunisées 68 %

Chez les souris paralysées, l'autostérilisation du névraxe a été assez fréquente (tableau V).

B. — NATURE RABIQUE DES PARALYSIES CHEZ DES SOURIS AU NÉVRAXE AVIRULENT.

Les altérations histologiques sont d'ordre inflammatoire, avec des manchons périvasculaires et des processus dégénératifs des neurones de la corne d'Ammon, telles qu'elles ont été décrites

TABLEAU V.

SURVIE (jours)	INCUBATION (jours)	PHASE PARALYTIQ (jours)	TITRE DE LA VIRULENCE DU CERVEAU DES SOURIS EN DL50, DANS LA PHASE TERMINALE DE LA RAGE			
			Expérience A		Expérience B	
			TÉMOINS	VACCINÉES	TÉMOINS	VACCINÉES
7-9	5-8	1-2	- *	- *	10-5,0	10-3,0
			-	-	10-4,3	-
			-	-	10-4,3	-
			-	-	10-4,3	-
			-	-	10-3,7	-
10-11	7-9	1-4	10-4,9	- *	10-5,0	10-3,9
			10-4,3	-	10-4,5	10-1,0
			10-4,3	-	- **	0
			10-4,3	-	-	0
			10-4,2	-	-	0
			10-3,5	-	-	0
12-13	8-12	1-5	10-5,0	10-4,2	-	0
			10-4,2	10-4,0	-	0
			10-3,6	10-3,5	-	0
14-15	9-13	2-6	10-5,0	10-4,8	-	0
			10-4,7	10-3,9	-	0
			10-3,3	0	-	0
16-17	12-16	1-4	10-4,7	10-2,7	-	-
				0 0 0	-	-
18-24	12-19	8-12	10-4,8	10-3,3	-	-
			10-4,2	10-3,3	-	-

* Pas d'animaux paralysés agonisants à cette époque. ** Toutes les souris témoins de l'expérience B ont succombé entre sept et onze jours après l'infection cérébrale. O, cerveau non virulent.

par divers auteurs [12, 13, 16], et par nous-mêmes [4]. Chez des animaux à très longue période paralytique de dix-huit à vingt et un jours, malgré l'avirulence du cerveau, nous n'avons jamais mis en évidence de processus de démyélinisation caractéristique des « accidents neuro-paralytiques allergiques » consécutifs au traitement antirabique.

D'autre part, les paralysies n'apparaissent, chez les souris vaccinées, qu'à l'occasion de l'infection d'épreuve, leur fréquence étant rigoureusement conditionnée par l'efficacité du vaccin et par la voie d'infection :

VACCINS APPLIQUÉS	ÉPREUVE CÉRÉBRALE	ÉPREUVE PÉRITONÉALE
vaccin phéniqué tué	72 % paralysies	14 % paralysies
vaccin de Fermi	13 % paralysies	0
souris témoins	93 % paralysies	43 % paralysies

Ces résultats prouvent que le syndrome neuro-paralytique, vu chez des animaux dont le cerveau s'est révélé avirulent, n'est pas dû à un processus neuro-allergique consécutif à la vaccination, mais doit être attribué à une infection rabique réelle, aboutissant à l'autostérilisation.

★
★★

Le phénomène d'autostérilisation nous explique aujourd'hui le manque de virulence des nerfs périphériques (septinévrite négative) et des glandes salivaires (rage « fermée »), tel que nous l'avions observé auparavant [3, 21], chez la plupart des animaux et des sujets humains vaccinés et néanmoins morts de rage. La fréquence quasi constante de l'autostérilisation du névraxe dans la rage des animaux partiellement immunisés prouve sans aucun doute, que l'infection rabique se comporte comme toute autre neurovirose autostérilisable et curable, telles les encéphalites, la poliomyélite, etc., à condition que l'organisme sensible reçoive par la vaccination le correctif d'un certain degré de résistance. Ce comportement implique la nécessité de renoncer, au moins chez des sujets humains vaccinés, à l'euthanasie par la morphine, et d'adopter une thérapeutique symptomatique adéquate, pour permettre au malade de dépasser la période critique des premiers jours de maladie et d'entrer ainsi dans la phase d'autostérilisation totale du névraxe.

CONCLUSIONS.

Par la vaccination antirabique on prolonge la période d'incubation et la durée de la maladie chez des souris, atteintes, malgré la vaccination, de paralysies à la suite de l'infection cérébrale d'épreuve. Dans la rage provoquée, le névraxe s'autostérilise à peu près constamment ($DL_{50} = 0$).

Le processus d'autostérilisation peut quelquefois aboutir à la « rage paralytique guérie », caractérisée par des séquelles neuromusculaires persistantes, avec impotence fonctionnelle, comparables à celles de la poliomyélite.

Le syndrome paralytique, vu chez les animaux au névraxe devenu avirulent, est bien de nature rabique, et se distingue des « accidents nerveux allergiques », avec processus de démyélinisation consécutifs au traitement antirabique.

En général, la rage se comporte, chez des organismes partiellement immunisés, comme toute autre infection neurovirale autostérilisable et curable, telles les encéphalites ou la poliomyélite.

SUMMARY

AUTOSTERILIZATION AND RECOVERY IN EXPERIMENTAL RABIES.

By means of antirabic immunization, it is possible to lengthen the incubation period and the duration of the disease in immunized mice which become paralyzed after an intracerebral chal-

lence inoculation. In this case, the central nervous system is almost always autosterilized ($DL_{50} = 0$).

The autosterilization process may sometimes result in a « cured paralytic rabies », characterized by durable neuro-muscular sequelae, with functional impotence, as in poliomyelitis.

The paralytic syndrom in animals, the central nervous system of which has become avirulent, is actually a rabic one, and differs from « allergic nervous accidents » with demyelination, due to antirabic treatment.

Rabies generally behaves in partially immunized animals like any other autosterilizable, neurotropic, curable disease, as encephalitis and poliomyelitis.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BABES (V.). *Traité sur la rage*, Baillière, édit., Paris, 1912.
- [2] BABES (V.) et BOBES (S.). *Bull. Section scientif. Acad. Roum.*, 1921, n° 1-3, 8.
- [3] BALTEANU (I.), CONSTANTINESCO (N.) et TOMA (A.). *Arch. roum. Path.*, 1948, **15**, 135.
- [4] CONSTANTINESCO (N.), TOMA (A.) et DRAGOMIR (C.). *Anal. Acad. R. P. R., Seria medicala*, 1950, **2**, 345 (résumé français).
- [5] CONSTANTINESCO (N.), DUCA (M.), DUCA (E.) et CHEPTEA (A.). *Acad. R. P. R., Studii si Cercetari Inframicrobiol., Microbiol., Parasitol.*, 1955, **6**, 9 (résumé français).
- [6] CONSTANTINESCO (N.), BIRZU (N.), TEODOROVICI (Gr.) et STAVRI (N.). Colloque sur la Rage, Lyon, mai 1956, in *Presse méd.*, 1956, n° 69.
- [7] CONSTANTINESCO (N.) et BIRZU (N.). *Acad. R.P.R., Studii si Cercetari Inframicrobiol., Microbiol., Parasitol.*, 1957, n° 4 (résumé français).
- [8] IONESCO-MIHAESTI (C.), TUPA (Al.) et MESROBEANU (I.). *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 919.
- [9] IONESCO-MIHAESTI (C.), TUPA (Al.) et WISNER (B.). *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 12.
- [10] JELESIC (Z.) et ATANASIU (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 786.
- [11] LÉPINE (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 388.
- [12] LÉPINE (P.). Rage, virus rabique, in *Les ultravirus des maladies humaines*, par C. Levaditi et P. Lépine, Maloine, édit., Paris, 1948.
- [13] LÉPINE (P.) et SAUTIER (V.). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 805.
- [14] LEVADITI (C.), SANCHIS-BAYARRI (V.) et SCHOEN (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 911.
- [15] LEVADITI (C.), LÉPINE (P.) et SCHOEN (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **101**, 116.
- [16] LEVADITI (C.), LÉPINE (P.) et SCHOEN (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **101**, 1050.
- [17] NICOLAU (S.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **105**, 177.

- [18] NICOLAU (S.) et KOPCIEWSKA (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **101**, 650 ; 1930, **104**, 1139.
 - [19] NICOLAU (S.), MATHIS (C.) et CONSTANTINESCO (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1933, **50**, 778.
 - [20] NICOLAU (S.) et GALLOWAY (I. A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 852 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1930, **45**, 457.
 - [21] NICOLAU (S.), CONSTANTINESCO (N.), DRAGOMIR (C.) et PUIU (E.). *Anal. Acad. R.P.R., Seria medicala*, 1950, **2**, 617 (résumé français).
 - [22] NICOLAU (S.), CONSTANTINESCO (N.), TOMA (A.), DRAGOMIR (C.), ADERMA (I.), DUCA (E.) et DUCA (M.). *Rev. Sci. méd. (Acad. P.R.P.)*, 1954, **2**, 30.
-

RECHERCHE DES SUBSTANCES DE GROUPES SANGUINS CHEZ LES CHEVAUX ET LES MULETS

par M^{me} L. PODLIACHOUK et A. WROBLEWSKI (*) (**).

(*Institut Pasteur,*
Centre d'Etude des Groupes Sanguins des Animaux
[Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE])

L'étude des substances solubles des groupes sanguins des animaux ne peut être réalisée sans connaissance préalable de leurs antigènes érythrocytaires.

Lors des travaux de l'un de nous [9] sur les groupes sanguins des équidés, nous avons montré l'existence chez ces animaux de 11 antigènes érythrocytaires désignés par les lettres A à K. On peut les mettre tous en évidence chez le mulet. Dix de ces antigènes existent chez le cheval, alors que seul l'antigène B se trouve chez l'âne.

La recherche d'antigènes solubles consiste dans l'étude de l'activité d'un sérum de référence, après l'avoir mis en contact avec le liquide à examiner (sérum, salive ou extrait d'organe). L'inhibition de l'activité du sérum de référence prouve la présence d'un antigène soluble correspondant dans le liquide par lequel ce sérum a été absorbé.

Herman [6] a constaté, en 1936, qu'il y a similitude entre les agglutinogènes (A et B) et agglutinines (α et β) de l'homme et du cheval, et aussi que certains organes internes du cheval (foie, rate, rein et cœur) contiennent les composants du groupe correspondant à ceux du sang.

Brahn et Schiff [2], en 1929, ont observé que certains chevaux possèdent, dans leur salive, de grandes quantités d'une substance se rapprochant de l'antigène du groupe A humain.

Landsteiner [8], en 1936, a montré la présence de la substance A dans la salive du cheval (dans environ 75 p. 100 des cas examinés).

Friedenreich et Thyssen [5], en 1937, ont étudié la salive de 52 chevaux. Ils ont trouvé la substance A quarante-quatre fois, B trois fois et AB quatre fois ; une seule fois les deux substances étaient absentes.

(*) Boursier de l'Académie des Sciences de Pologne.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 6 février 1958.

Ils ont, d'autre part, constaté qu'il « n'existe pas, chez le cheval, de groupement de sang correspondant ».

Boyd [4], en 1939, a étudié la salive de 12 chevaux. Il a trouvé cinq fois la substance A, deux fois la substance B et dans 5 cas toutes les deux étaient absentes.

Kazal et coll. [7] ont étudié, en 1947, la répartition des substances A et B dans la salive et dans l'estomac des chevaux. A l'étude de la salive chez 11 chevaux, ils ont trouvé la substance A cinq fois, la substance B deux fois et les deux ensemble quatre fois. Ils ont trouvé que la répartition des substances A et B dans la salive était différente de celle de l'estomac.

Fine [4] a montré la présence des substances A et B dans les extraits d'organes de chevaux (estomac, glandes salivaires et pancréas). Il n'a pas trouvé ces substances dans des extraits de quatre testicules et d'un placenta. Une substance déterminée, absente dans un organe, est parfois présente dans un autre chez le même animal.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

1° *La salive* est recueillie directement dans un petit tube à l'aide d'un petit fragment d'éponge tenu par une pince. Elle est immédiatement diluée à 1/10 dans de l'eau physiologique, pour éviter le phénomène d'absorption non spécifique. Elle est ensuite chauffée pendant vingt minutes dans un bain-marie bouillant, pour inactiver les enzymes.

2° *Extraits d'organes*. La technique d'extraction utilisée est celle de la digestion enzymatique de l'organe par de la papaine à 70°, suivie d'une ébullition, filtration et stérilisation.

3° *Réaction d'inhibition*. Le liquide à examiner (0,1 ml) est mis en contact avec un volume égal d'un sérum de référence pendant trente minutes, à la température du laboratoire. On procède ensuite au titrage de ce mélange vis-à-vis des globules rouges correspondant au sérum de référence. Après un séjour des tubes pendant trente minutes à la température du laboratoire, on fait la lecture, après une minute de centrifugation à 1 500 tours, à l'aide d'un miroir concave.

On ajoute un tube témoin de l'activité du sérum de référence, où le liquide à examiner est remplacé par un volume égal d'eau physiologique.

On contrôle également l'absence de pouvoir agglutinant du liquide à examiner vis-à-vis des globules rouges utilisés dans la réaction.

Nous avons recherché les substances des antigènes érythrocytaires équins et asins dans le sérum, la salive et les extraits d'organes des équidés, et aussi les antigènes A et B humains dans leur salive. Nous avons choisi pour cette étude des animaux possédant dans leur structure antigénique un facteur érythrocytaire déterminé, ainsi que d'autres qui ne le possédaient pas.

ANTIGÈNES ÉQUINS ET ASINS.

1° *Sérum* : aucun des neuf antigènes érythrocytaires équins A, C, D, E, F, H, I, J et K n'a été décelé sous forme soluble dans le sérum des chevaux examinés.

2° *Salive* : aucun des huit antigènes érythrocytaires équins ou asins A, B, C, D, E, F, H et J n'a été décelé sous forme soluble dans la salive des 20 chevaux et 11 mulets examinés.

3° *Extraits d'organes* : 45 extraits d'organes des 17 chevaux examinés (17 estomacs, 17 glandes salivaires, 6 pancréas, 4 testicules et 1 placenta) ont été mis en contact avec 7 isoagglutinines anti-ACEHIJK. Dans la plupart des cas nous n'avons pas observé d'inhibition de l'activité du sérum de référence.

Trois seulement de ces extraits ont inhibé l'activité de toutes les isoagglutinines, ce qui est probablement dû à une contamination bactérienne.

Les résultats de cette étude nous permettent de conclure à l'absence des 7 antigènes érythrocytaires équins sous forme soluble dans les extraits d'organes examinés.

ANTIGÈNES A ET B HUMAINS.

Comme unité des substances A et B humaines, nous avons désigné, dans notre étude, arbitrairement, la plus petite quantité capable d'inhiber complètement l'activité d'une isohémagglutinine humaine anti-A ou anti-B titrant 1/8. Nous avons recherché

TABLEAU I. — Distribution des substances A et B humaines dans la salive de 53 équidés.

Taux	Substance A Nombre de cas	Substance B Nombre de cas
au dessous de 10 unités	8	35
10	2	0
20	8	10
40	10	5
80	9	1
160	10	1
320	5	1
640	1	0

les substances A et B humaines dans la salive (diluée à 1/10) de 11 mulets et 42 chevaux. Nous avons trouvé la substance A vingt-neuf fois, la substance B deux fois, les deux ensemble seize fois et constaté leur absence six fois. Nous avons observé que le taux de substance A dans la salive est généralement plus élevé que celui de la substance B. Les taux les plus élevés de

substance B (320 et 160 unités) ont été observés dans la salive où nous n'avons pas décelé la substance A.

Ce travail fait suite à nos recherches antérieures sur d'autres espèces animales : porc [10] et bœuf [11]. Nous avons constaté que, dans la salive des porcs et des bovins, le taux de la substance A humaine était en relation étroite avec le groupe sanguin de l'animal examiné. Ceci ressort de la communauté antigénique des facteurs érythrocytaires A humain, A porcine et J bovin.

Par analogie nous avons cru pouvoir aussi établir chez les équidés une relation semblable entre la présence de substances A et B humaines et le groupe sanguin de l'animal examiné.

Or, l'étude de la salive, du sérum et d'extraits d'organes des chevaux et mulets examinés n'a pas permis de constater la présence sous forme soluble d'antigènes érythrocytaires équins et asins connus par nous.

De même, lors de notre précédent travail avec A. Eyquem [3], nous n'avions pu trouver dans le sérum des chevaux et des mulets d'inhibiteurs pour les isoagglutinines anti-A humaine et anti-A porcine, ni pour l'isohémolysine anti-J bovine.

En conclusion, il nous est difficile d'expliquer la présence de substances A et B humaines dans la salive et les extraits de certains organes de chevaux alors que les facteurs érythrocytaires correspondants n'ont pu être décelés. La découverte d'autres antigènes érythrocytaires permettra peut-être de résoudre ce problème.

RÉSUMÉ.

1° Nous n'avons pas constaté la présence d'antigènes érythrocytaires de groupes sanguins équins et asins sous forme soluble dans le sérum, ni dans la salive ou l'extrait de certains organes de chevaux et de mulets examinés.

2° Dans la salive de chevaux et de mulets nous avons, de même que les chercheurs qui nous ont précédés, montré la présence des substances A et B humaines.

3° Nous n'avons constaté aucune corrélation entre la présence des substances A et B humaines et le groupe sanguin de l'animal examiné.

SUMMARY

EXAMINATION OF HORSE AND MULE SERA FOR THE PRESENCE OF BLOOD GROUP SUBSTANCES.

1. The presence of horse and mule soluble erythrocytic blood group antigens could not be demonstrated in sera, saliva and extracts of organs of horse and mule.

2. In horse and mule saliva, human A and B substances have

been demonstrated, according to the results already obtained by other authors.

3. There is no relationship between the presence of human A and B substances and the blood group of the animal.

★★

Nous tenons à remercier vivement M. Nicol, Directeur de l'Annexe de l'Institut Pasteur à Garches, les docteurs vétérinaires Girard, Corvazier et Cheyroux, qui ont bien voulu prélever pour nous les échantillons de sang de chevaux et de mulets, et aussi M^{lle} Amoureux pour la préparation des extraits d'organes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOYD (W. C.). *Tab. Biolog.*, 1939, **47**, 113.
 - [2] BRAHN (B.) et SCHIFF (F.). *Klin. Wschr.*, 1929, **8**, 1523.
 - [3] EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (M^{me} L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 419.
 - [4] FINE (J.). Communication personnelle.
 - [5] FRIEDENREICH (V.) et THYSSEN (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **426**, 801.
 - [6] HERMAN (V. A.). *J. Immunol.*, 1936, **31**, 347.
 - [7] KAZAL (L. A.) et coll. *Arch. Bioch.*, 1947, **43**, 329.
 - [8] LANDSTEINER (K.). *J. exp. Med.*, 1936, **63**, 185.
 - [9] PODLIACHOUK (M^{me} L.). *Thèse doct. ès sciences*, Paris, 1957.
 - [10] PODLIACHOUK (M^{me} L.) et WROBLEWSKI (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 2867.
 - [11] WROBLEWSKI (A.), PODLIACHOUK (M^{me} L.) et MILLOT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 456.
-

DÉVELOPPEMENT ABORTIF D'UN BACTÉRIOPHAGE DE *BACILLUS MEGATERIUM*

par Hélène IONESCO et Norbert GRELET (*)

(avec la collaboration technique de M^{me} E. RITZ).

(Institut Pasteur,
Service de Physiologie Microbienne et Service des Fermentations)

INTRODUCTION

Lorsqu'une population bactérienne est infectée par des bactériophages tempérés, certaines bactéries se lysent en produisant du phage, d'autres deviennent lysogènes, d'autres enfin meurent sans produire du phage. Dans cette dernière fraction, en général négligeable, le développement du phage est abortif.

La réponse d'une bactérie à l'infection par un phage donné varie suivant la souche microbienne et l'état physiologique des bactéries. De nombreux facteurs : température, constitution du milieu, multiplicité d'infection, jouent un rôle important dans le sort de la bactérie [1, 2, 3, 4].

Nous décrivons, dans ce mémoire, un système presque exclusivement abortif, constitué par le phage tempéré 1 et une souche non lysogène de *Bacillus megaterium*. Nous montrons que l'infection abortive est prédominante, mais qu'une faible fraction de bactéries reproduit le phage et qu'un petit nombre enfin est lysogénisé. L'induction des souches lysogènes donne de même une réponse abortive prédominante. Enfin l'étude comparative des bactéries infectées et induites suggère que c'est la souche bactérienne qui impose à la phase végétative son caractère abortif.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

SOUCHES BACTÉRIENNES ET BACTÉRIOPHAGES. — Notre travail a été effectué avec la souche MLB de *Bacillus megaterium* (Collection de l'Institut Pasteur : n° 52-21) sporogène et non lysogène [5].

Le « mutilat » asporogène sensible M, nous a servi comme souche détectrice.

(*) Manuscrit reçu le 24 février 1958.

Le bactériophage 1 est produit par induction de la souche lysogène 899 (1)+0 ; le bactériophage 2 est produit par la souche lysogène 17 (2) non inductible [6].

MILIEUX LIQUIDES. — Bouillon « Difco broth » : 8 g/l ; KCl : $1,3 \times 10^{-2}$ M ; SO_4Mg , $7\text{H}_2\text{O}$: 10^{-3} M ; Cl_2Mn , $4\text{H}_2\text{O}$: 10^{-5} M ; SO_4Fe , $7\text{H}_2\text{O}$: 10^{-6} M.

Tampon : $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 5×10^{-3} M ; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$: 10^{-3} M ; SO_4Mg , $7\text{H}_2\text{O}$: 10^{-3} M ; $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$: 10^{-3} M ; KOH pour pH 7.

MILIEUX SOLIDES. — Macération de viande, 100 ml ; peptone (Uclaf), 10 g ; NaCl, 10 g ; eau bidistillée, 900 ml, NaOH pour pH 7. Ce milieu est gélifié à 12 g/l pour la couche inférieure des boîtes de Petri ; à 7 g/l pour la couche supérieure dans laquelle est fait le mélange de phage et de bactéries sensibles ; à 20 g/l pour les numérations des bactéries.

PRÉPARATIONS DES CULTURES. — La croissance de *B. megaterium* en milieu liquide conduit à la formation de longues chaînes, qui rendent difficile l'interprétation quantitative des résultats. Nous avons évité cet inconvénient en ensemençant massivement le bouillon avec une suspension de spores. Après quatre heures d'agitation à 37°, on obtient, à partir des spores, une culture homogène contenant de courtes chaînes de 2 ou, rarement, 4 éléments. Les densités optiques des cultures ont été mesurées à l'électrophotomètre de Meunier : pour un trajet optique de 1 cm, une graduation de l'appareil correspond à $3,4 \times 10^6$ bâtonnets/ml.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

ACTION LÉTALE DU PHAGE 1 SUR LES BACTÉRIES MLB.

Nous n'avons jamais réussi à mettre en évidence des bactériophages dans la souche de *B. megaterium* MLB. Cette souche n'est donc vraisemblablement pas lysogène. Le phage 2 donne le même nombre de plages sur les bactéries sensibles classiques M (mutilat) et sur la souche MLB. Le phage 1 ne donne aucune plage sur la souche MLB, même quand on étale 10^8 particules infectieuses. C'est la nature de cette « résistance » que nous avons étudiée.

Si l'on dépose à la surface d'une gélose préalablement ensémencée avec une culture de *B. megaterium* MLB I goutte d'une suspension concentrée de phage 1, on observe, après seize heures à 37°, un disque plus clair à l'endroit où la goutte a été déposée. Si la goutte, qui s'étale sur une surface d'environ $0,5 \text{ cm}^2$, renferme moins de 10^4 phages, sa trace n'est pas visible après développement du tapis bactérien.

Cette inhibition de la croissance bactérienne par une suspension concentrée de bactériophages met également en question la pré-

sence éventuelle d'une bactériocine dans la préparation de phages. Deux observations nous ont permis d'éliminer l'hypothèse de l'action d'une bactériocine dans le phénomène étudié :

a) Les phages inactivés par les rayons ultra-violets, qui n'inactivent pas les bactériocines, n'exercent aucune influence sur la croissance des bactéries MLB ;

b) Le surnageant obtenu après centrifugation d'une suspension de phages à 25 000 g, qui ne sédimente pas les bactériocines,

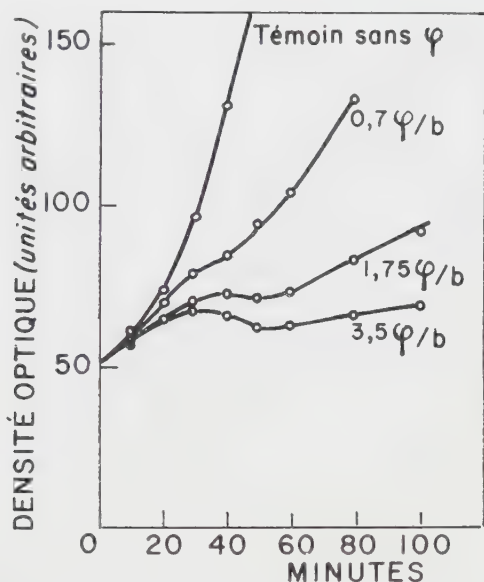


FIG. 1. — Courbes des densités optiques des cultures de *B. megaterium* MLB infectées par le phage 1 à différentes multiplicités.

n'empêche pas le développement normal des cultures mises en sa présence.

Nous nous sommes alors demandé si le phage 1 s'adsorbe sur les bactéries MLB et si, dans ce cas, il exerce bien une action létale ? Deux séries d'expériences nous ont permis de répondre à ces questions :

A. *Analyse des courbes de densité optique des cultures infectées.* — Les expériences d'adsorption en milieu liquide ont montré que le phage 1 s'adsorbe aussi bien sur les bactéries MLB que sur les bactéries sensibles M. Dans les conditions de nos expériences plus de 90 p. 100 des phages sont adsorbés en dix minutes à 37°, dans du bouillon Difco + 0,2 g/l $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$. Une série de

cultures de bactéries MLB ont été infectées à des multiplicités différentes et des courbes de densité optique établies pour la période qui suit l'infection. On voit sur la figure 1 que, trente minutes après l'infection, les densités optiques des cultures cessent d'augmenter, s'arrêtent en palier ou subissent une légère diminution et que la croissance reprend d'autant plus rapidement que la multiplicité est plus faible. Ainsi, la seule analyse des courbes de densité optique après infection nous conduit à penser que c'est bien le phage qui arrête la multiplication des bactéries sur lesquelles il s'est adsorbé.

B. *Survie des bactéries MLB après infection par le phage 1.* — Le phage 1 provoque donc l'arrêt de la croissance des cultures de *B. megaterium* MLB. Cet arrêt de la croissance traduit-il la mort des bactéries ? Une culture d'une densité optique correspondant à 10^8 bactéries/ml est infectée à raison de 2 phages par bactérie. A trois, six et douze minutes après l'infection on fait une numération des bactériophages non adsorbés et des bactéries survivantes. Un tube témoin sans phage nous donne le nombre des bactéries au moment initial.

Les résultats de cette expérience sont donnés dans le tableau I.

TABLEAU I. — Proportion expérimentale et proportion calculée des germes survivant à l'infection.

Nombre initial de bactéries (d'après la densité optique) : 100×10^9 /ml				
Nombre initial de bactériophages : 200×10^9 /ml				
Durée d'adsorption (minutes)	0	3	6	12
Germes comptés par numération de colonies :				
1) Dans le témoin sans phage	53			
2) Après infection à multiplicité 2		33	25	21
Proportion expérimentale des germes survivants		0,625	0,470	0,395
Nombre de phages adsorbés		100	157	191
$n = \frac{\text{Nombre de phages adsorbés}}{\text{Nombre initial de germes}}$		1,9	2,95	3,6
Proportion calculée des germes survivants(*)		0,625	0,405	0,304

(*) Chaque germe est considéré comme une chaîne de deux bactéries. Si un seul phage suffit à tuer une bactérie, la proportion des germes survivants est donnée

$$\text{par la formule : } \frac{e^{-n}}{2} = e^{-n}.$$

S'il suffit d'un phage adsorbé pour tuer une bactérie, il faut tenir compte du fait que chaque bâtonnet d'une chaîne doit avoir adsorbé au moins un phage pour que la chaîne ne soit plus susceptible de former une colonie. Dans les conditions de notre expérience, on considère chaque chaîne formée par deux éléments. Le tableau I montre une concordance satisfaisante entre le nombre de bactéries survivantes calculé et le nombre de bactéries survivantes trouvé expérimentalement.

Nous pouvons donc conclure que le bactériophage 1 a un effet létal sur les bactéries MLB et qu'un seul phage suffit à tuer une bactérie.

PRODUCTION DE BACTÉRIOPHAGES PAR LES BACTÉRIES MLB INFECTÉES PAR LE PHAGE 1.

Nous avons vu que, trente minutes après l'infection par le phage 1, la culture de *B. megaterium* MLB présente un arrêt de croissance suivi d'une légère baisse de la densité optique. Il n'y a pas de libération de phages entre la trentième et la quarante-cinquième minute. Entre la quarante-cinquième et la soixantième minute quelques bactériophages font leur apparition. Bien que l'infection soit généralement abortive, il y a donc quelques bactéries qui reproduisent le phage.

L'analyse des productions individuelles (tableau II) montre qu'il n'y a qu'une bactérie productrice pour 20 à 30 000 bactéries infectées et que le rendement individuel est très variable : pour la moitié des bactéries productrices, il s'échelonne entre un seul phage et une vingtaine ; pour l'autre moitié, il atteint les valeurs que l'on obtient habituellement avec des souches sensibles normales.

Les phages produits par les bactéries MLB sont identiques à ceux qui se multiplient normalement dans une souche sensible M. Ils ne sont pas pour autant plus aptes à se reproduire normalement sur les bactéries MLB. Ils ne sont donc ni des mutants, ni des phages ayant subi une modification phénotypique induite par l'hôte.

INDUCTION DES SOUCHES LYSOGÈNES.

A partir des bactéries MLB ayant survécu à l'infection par le phage 1 nous avons isolé quelques souches lysogènes. Les diverses souches MLB lysogènes se comportent différemment à la suite de l'irradiation par les rayons ultra-violet. Toutes montrent une croissance résiduelle après l'irradiation. Cette croissance s'arrête chez certaines souches à partir de la vingt-cinquième minute après

TABLEAU II. — Production de bactériophages par les bactéries MLB après infection par le phage 1.

Expériences	I	II
Durée de l'expérience (minutes)	80	80
Bactéries par tube (temps 0)	15×10^3	10×10^3
Nombre total de tubes	104	28
Nombre de plages	Nombre de tubes	
0	42	20
1 à 10	24	—
11 à 20	2	0
21 à 30	0	0
31 à 40	0	0
41 à 50	1	0
51 à 100	6	2
101 à 200	9	1
201 à 300	4	1
301 et plus	13	0
Nombre de tubes contenant plus d'une bactérie productrice	22	1
Nombre moyen de bactéries productrices par tube	0,22	0,34
Nombre de bactéries productrices pour 10^6 bactéries infectées	59	4

Des bactéries cultivées en bouillon Difco + 0,2 g/l $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ sont infectées à raison d'environ 5 phages par bactérie. Après dix minutes à 37° la culture est traitée par du sérum antiphage au 1/100. La culture est ensuite centrifugée, remise en suspension, diluée et répartie dans une série de tubes, de façon à avoir environ une bactérie productrice sur trois tubes. Après quatre-vingts minutes à 37° le contenu de chaque tube est étalé sur gélose en présence de bactéries sensibles M.

l'irradiation et n'est pas suivie de lyse. Certaines autres souches se lysent entre la trente-cinquième et la soixantième minute (fig. 3 A).

L'analyse des production individuelles montre que la plupart des bactéries tuées par induction ne produisent pas de phage. Dans l'expérience représentée par le tableau III, la proportion

TABLEAU III. — Production de bactériophages par les bactéries lysogènes MLB (1) induites.

Durée de l'expérience (minutes)	30
Nombre de bactéries par tube (temps 0)	200
Nombre total de tubes	40
Nombre de tubes contenant	
0 phage	27
1	7
2	4
3	2
4	2
6	1
7	1
8	1
11	1
15	1
30	1
53	1
Nombre de tubes contenant plus d'une bactérie productrice	6
Nombre moyen de bactéries productrices par tube	0,6
Nombre de bactéries productrices pour 10^3 bactéries induites	3

Une culture de bactéries en croissance exponentielle en bouillon Difco est centrifugée, lavée deux fois et remise en suspension. Après irradiation par les rayons ultra-violet, la suspension est diluée et distribuée dans des tubes à raison de 200 bactéries par tube. Après quatre-vingts minutes à 37° le contenu de chaque tube est étalé en présence de streptomycine et de bactéries M sensibles au phage et résistantes à l'antibiotique.

des bactéries productrices est de 3 sur 1 000. Les rendements individuels sont compris entre 1 et 53. La figure 2 montre qu'ils se distribuent selon une droite de pente voisine de -1 , tout à fait

comparable à celle observée par Jacob et Wollman [7] avec une souche défective d'*E. coli* K12 (λ). Nous avons observé, en outre, que les souches lysogènes qui ne se lysent pas à la suite de l'irradiation ultra-violette sont des souches sporogènes comme la souche MLB originelle, tandis que celles qui subissent la lyse ont perdu la capacité de sporuler. Rien ne nous permet d'affirmer qu'il y a une relation entre le caractère asporogène de certaines

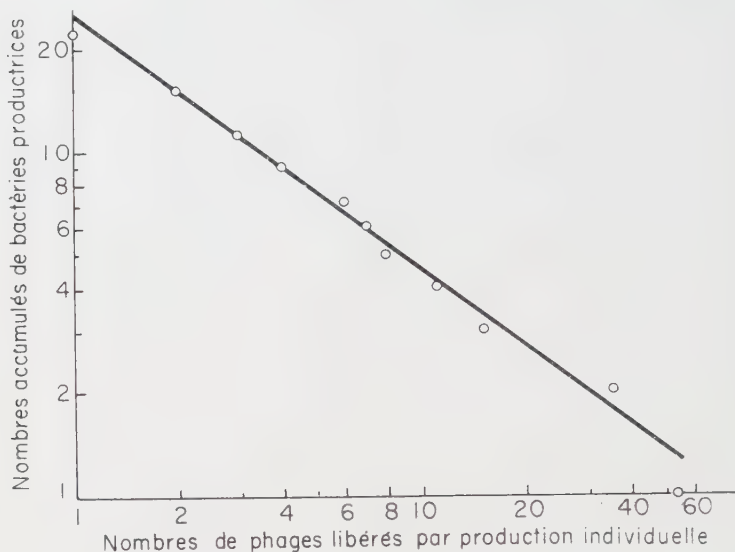


FIG. 2. — Distribution des productions individuelles de bactéries MLB (1) induites (même expérience que celle du tableau III). En ordonnée, le nombre de tubes contenant un nombre de phages égal ou supérieur à N ; en abscisse, le nombre N de phages libérés dans un tube, c'est-à-dire pratiquement par une bactérie productrice.

souches et leur aptitude à se lyser. Nos observations restent limitées aux souches que nous avons étudiées.

COMPARAISON ENTRE L'INDUCTION DES SOUCHES LYSOGÉNISÉES ET L'INFECTION DES SOUCHES GUÉRIES.

Nous avons vu que pour deux souches lysogènes, l'une sporogène, l'autre asporogène, les courbes de densité optique, après induction, sont différentes (fig. 3 A).

D'autre part, nous avons isolé, dans la descendance des souches lysogènes, les souches guéries correspondantes, et nous avons cherché s'il existe entre elles, après infection par le phage 1,

les mêmes différences qu'entre les souches lysogènes après induction.

Les deux souches guéries ont été infectées à haute multiplicité et les courbes de densité optique établies (fig. 3 B).

La souche sporogène répond à l'infection comme à l'induction par un arrêt de croissance, et elle ne se lyse pas. Cette souche a donc gardé les mêmes caractères que la souche MLB sporogène initiale.

La souche asporogène présente, au contraire, une lyse presque

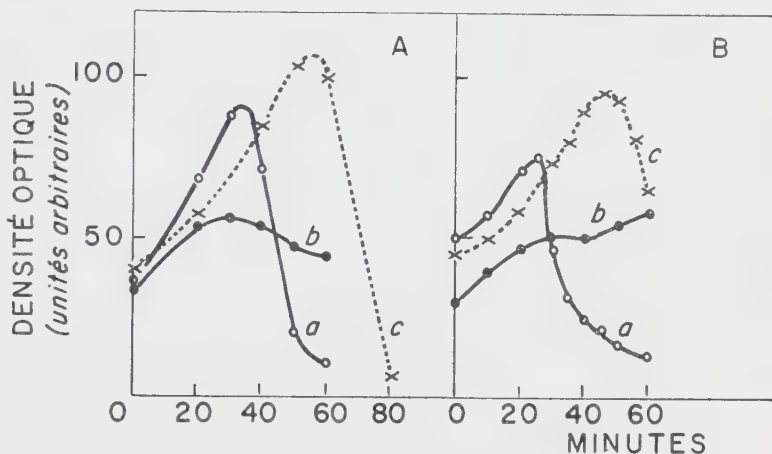


FIG. 3. — A. Courbes d'induction par les rayons ultra-violet des bactéries lysogènes MLB (1) asporogènes (a), MLB (1) sporogènes (b) et 899 (1)+ (c). B. Courbes d'infection par le phage 1 des bactéries MLB guéries asporogènes (a), MLB guéries sporogènes (b) et sensibles M (c). A temps 0, les bactéries lysogènes sont irradiées avec une dose de rayonnement ultra-violet qui induit le développement du phage 1 dans plus de 90 p. 100 des bactéries 899 (1)+ ; les bactéries guéries et sensibles sont infectées à raison de 5 phages par bactérie. Les cultures ainsi traitées sont agitées à 37° et leur évolution suivie par la mesure des densités optiques.

totale. Mais tandis que la période latente du phage 1 sur les bactéries normales M est de quarante-cinq minutes, les bactéries guéries asporogènes se lysent déjà à partir de la vingt-cinquième minute. De même l'induction des bactéries lysogènes asporogènes déclenche la lyse après trente-cinq minutes, alors que les bactéries lysogènes 899 (1)+ ne commencent à se lyser que vers la cinquantième minute. Il ne s'agit certainement pas, dans le système bactéries MLB-phage 1, d'une modification dans le temps de la période latente. Nous avons vu que les rares bactéries produc-

trices libèrent le phage entre quarante et soixante minutes. Il est vraisemblable que la lyse précoce des bactéries MLB est induite par le commencement du développement du phage 1. Elle semble être favorisée par un état particulier des bactéries MLB qui les rend plus sensibles à certaines synthèses létales.

Ainsi dans les bactéries MLB, qu'elles soient sporogènes ou asporogènes, le développement du phage 1 est abortif et léthal. Toutefois, selon les souches, les bactéries tuées par infection ou par induction ne se lysent pas (sporogènes) ou subissent une lyse presque complète (asporogènes).

DISCUSSION.

L'ensemble de nos résultats pose le problème du déterminisme de l'infection abortive, celui du déterminisme de la lysogénie abortive et celui des rapports qui peuvent exister entre l'une et l'autre.

Dans le cas des souches lysogènes *défectives* d'*E. coli* K12 (λ), le défaut de production de bactériophages est la conséquence d'une lésion du matériel génétique du prophage [8]. Chez d'autres souches d'*E. coli* K12, il a été prouvé que ces lésions se trouvent localisées sur le chromosome du phage en plusieurs endroits différents et entraînent, selon leur localisation, une perturbation soit dans la multiplication, soit dans la morphogénèse du phage [7, 9, 10].

Dans le système *B. megaterium* MLB-phage 1, la phase végétative est presque exclusivement abortive, qu'elle ait été déclenchée par induction du prophage ou par infection. Une très faible fraction des bactéries reproduisent le phage aussi bien après infection qu'après induction. L'analyse des productions individuelles nous a montré qu'après infection, il n'y a qu'une bactérie productrice sur 20 à 30 000 bactéries infectées. Parmi celles-là la moitié environ produisent un petit nombre de bactériophages (1 à 20), l'autre moitié donne des productions individuelles qui correspondent aux rendements normaux du phage 1.

L'analyse des productions individuelles après induction nous a révélé, par contre, une série de valeurs qui s'échelonnent selon une distribution clonale du type Luria, tout à fait semblable à celle observée par Jacob et Wollman [7] avec une souche lysogène déficiente d'*E. coli* K12 (λ). Une telle distribution s'explique parfaitement si parmi les particules déficientes en voie de multiplication végétative des mutations se produisent vers la forme normale, aboutissant ainsi à la formation de particules infectieuses mûres. En fait, les phages produits par les bactéries MLB ne sont pas des mutants du phage 1 : ils continuent à donner une infection

abortive chez les bactéries MLB. Comme le phage 1 se développe normalement dans la souche M et ne se développe pas dans la souche MLB, nous pouvons conclure que le caractère abortif de la phase végétative n'est pas lié à un défaut génétique du phage. Nous sommes donc conduits à chercher, pour le caractère abortif aussi bien que pour les faibles productions individuelles constatées, une interprétation qui vaille aussi bien pour l'infection que pour l'induction.

Par infection de protoplastes de *B. megaterium*, Brenner et Stent [41] ont trouvé des rendements individuels très petits, qu'ils expliquent par la fragilité des protoplastes survenant au moment de l'apparition des premières particules du phage. Nous avons observé que les bactéries MLB se lysent ou cessent de croître vingt-cinq minutes après infection et trente-cinq minutes après induction, tandis que la période latente du phage 1 est de quarante-cinq minutes sur les bactéries normales M et que la souche lysogène 899 (1)⁺ se lyse à partir de la cinquantième minute après l'induction.

Dans une souche normale, la synthèse du matériel phagique et la maturation des particules infectieuses sont arrêtées par la lyse bactérienne. On sait aussi qu'une endolysine responsable de la lyse bactérienne par le phage a été mise en évidence au cours du développement du phage λ chez *E. coli* K12 [40] et que le développement du phage chez *Bacillus megaterium* est accompagné par la production d'un enzyme lytique [42]. La production prématurée d'un enzyme lytique chez le *B. megaterium* MLB rendrait compte de la lyse précoce et du caractère abortif de la phase végétative. Cependant, il n'y a pas de lyse dans la souche sporogène. Le caractère abortif du développement du phage 1 dans la souche MLB est donc lié à une lésion bactérienne précoce qui se manifeste ou non par la lyse.

RÉSUMÉ.

1° *Bacillus megaterium* MLB est une souche non lysogène. Le phage tempéré 1 ne donne pas de plages sur les bactéries MLB, mais s'y adsorbe normalement.

2° Les cultures de bactéries MLB infectées par le phage 1⁺ cessent de croître au bout de trente minutes après l'infection et subissent une lyse partielle. Cette lyse ne s'accompagne pas de libération de phages.

3° L'infection abortive, qu'elle soit déclenchée par plusieurs phages ou par un seul, est létale.

4° L'infection est abortive chez presque toutes les bactéries infectées : une seulement sur 20 à 30 000 reproduit le phage.

5° Des souches MLB (1) lysogènes ont été isolées. Le développement du phage dans ces souches est abortif.

6° Parmi les souches MLB (1), nous en avons trouvé qui sont sporogènes et d'autres qui sont asporogènes. L'irradiation par les rayons ultra-violets entraîne l'arrêt de la croissance des cultures lysogènes sporogènes et une lyse subtotale des cultures lysogènes asporogènes. Les mêmes différences se retrouvent à la suite de l'infection par le phage 1 des deux souches « guéries » correspondantes, sporogène et asporogène.

7° Le phage 1 produit par induction des bactéries MLB (1) lysogènes n'a pas acquis la propriété de se reproduire normalement sur la souche MLB originelle.

8° Dans un système normal les particules infectieuses apparaissent à partir de la quarante-cinquième minute. Le caractère abortif du système phage 1-souche bactérienne MLB de *Bacillus megaterium* est lié à une lésion bactérienne précoce qui interrompt la phase végétative.

SUMMARY

ABORTIVE DEVELOPMENT OF A *Bacillus megaterium* BACTERIOPHAGE.

1. *Bacillus megaterium* MLB is a non lysogenic bacterium. Temperate phage 1 gives no plaques on this strain, but adsorbs normally.

2. Cultures of *B. megaterium* MLB infected by phage 1 stop growing 30 minutes after infection and undergo partial lysis. This lysis does not liberate phage.

3. This abortive infection is always lethal.

4. Only one in 20 to 30 000 infected bacteria reproduce phage; the infection is abortive for almost all the bacteria in the culture.

5. Lysogenic strains of MLB, have been isolated. The development of phage is also abortive in these strains.

6. Both sporogenous and asporogenous strains have been found among various cultures of MLB (1). Irradiation with ultra violet light stops the growth of sporogenous lysogenic cultures and causes almost complete lysis of asporogenous lysogenic cultures. Non lysogenic strains were derived from both these sporogenous and asporogenous cultures.

Their growth characteristics after infection with phage 1 resembled those of their parent lysogenic cultures treated with U. V. light.

7. Phage 1 produced by induction of MLB (1) lysogenic bacteria does not reproduce normally in the original MLB strain.

8. In a normal system infectious particles appear at the 45th minute. The abortive character of the system phage 1-MLB strain of *Bacillus megaterium* is bound to an early bacterial lesion which interrupt the vegetative phase.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LIEB (M.). *J. Bact.* 1953, **65**, 642.
 - [2] BERTANI (G.) et NICE (S. J.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 202.
 - [3] LWOFF (A.), KAPLAN (A. S.) et RITZ (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 127.
 - [4] BERTANI (E.). *Virology*, 1957, **4**, 53.
 - [5] GRELET (N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 310.
 - [6] IONESCO (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1702.
 - [7] JACOB (F.) et WOLLMAN (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 282.
 - [8] APPELYARD (R. K.). *Genetics*, 1954, **39**, 440.
 - [9] APPELYARD (R. K.). *J. gen. Microbiol.*, 1956, **14**, 573.
 - [10] JACOB (F.), FUERST (C. R.) et WOLLMAN (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 724.
 - [11] BRENNER (S.) et STENT (G. S.). *Biöchim. Biophys. Acta*, 1955, **17**, 473.
 - [12] MURPHY (J. S.). *Virology*, 1957, **4**, 563.
-

NUMÉRATION DE LA MICROFLORE TOTALE ET MICROSTRUCTURE DES SOLS

II. — CONSÉQUENCES PRATIQUES

par J. AUGIER et D. LAVERGNE (*).

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol)

Dans notre première note [1] nous avons étudié le comportement des complexes bactério-argilo-humiques. Nous avons montré que le tropisme de ces derniers pour les parois des pipettes varie en fonction de la nature pédologique des sols. Nous avons pu également préciser que les parties les plus finement colloïdales étaient responsables, dans une grande mesure, des perturbations de proportionnalité au cours des dilutions. Enfin nous avons souligné l'importance de la défloculation du complexe argilo-humique, provoquant ainsi une désagrégation progressive des amas bactériens au cours des dilutions. C'est, nous semble-t-il, l'ensemble de ces phénomènes qui empêche de faire des numérations précises de germes telluriques. L'importance de ces différents facteurs n'étant pas la même pour chaque type de terre, les résultats ne sont que grossièrement comparables et ils le sont d'autant moins que la structure physico-chimique des sols comparés est plus différente.

Dans la présente note nous nous proposons de préciser les conditions nous paraissant les meilleures pour éviter les effets perturbateurs des complexe argilo-humiques, et donc permettant d'obtenir des dilutions aussi homogènes que possible, ce qui pose le problème du milieu dispersant. Il nous restera ensuite à résoudre le problème du milieu de culture. Ce problème, ne faisant pas partie du sujet de cette note, sera traité ultérieurement.

I. — ETUDE DU MILIEU DISPERSANT.

Nous avons comparé l'action de l'eau distillée, d'une solution de pyrophosphate à 1 p. 1 000 [2] et d'une eau minéralisée riche en calcium (eau de rivière ou de puits, ou eau distillée additionnée de 5 p. 1 000 de chlorure de calcium).

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 février 1958.

Pour ce faire, nous réalisons des suspensions de différentes terres dans les divers milieux ci-dessus. On commence par broyer au mortier 1 g de l'échantillon, puis on ajoute 10 ml de l'un des liquides précités. On verse dans des tubes à essai, et on observe la sédimentation pendant quinze à trente minutes, puis au bout de vingt-quatre heures.

Les essais ont porté sur un mor, une rendzine grise, une rendzine brune, un sol brun, une terre de jardin peu humifère.

L'aspect et la vitesse de la sédimentation obtenue dans chaque cas montrent que :

1° Seul le mor n'a pas été influencé (il sédimente peut-être un peu plus vite en eau minéralisée).

2° L'eau minéralisée provoque une sédimentation rapide avec maintien de la microstructure dans la plupart des cas. Dans un cas (terre de jardin peu humifère) elle a provoqué une floculation complète des éléments du sol, les particules humifères sédimentant plus vite que les autres (tandis qu'en eau distillée et en pyrophosphate la dispersion était totale).

3° L'eau distillée provoque une bonne dispersion avec sédimentation lente dans l'ensemble, sauf pour les terres riches en calcium. L'eau distillée reste donc sensible aux éléments minéraux de la terre. En outre, l'humus est toujours en partie dispersé par l'eau distillée [4]. Enfin, le culot de sédimentation obtenu dans les quinze à trente minutes n'a jamais un aspect lavé.

4° Le pyrophosphate de sodium à 1 p. 1 000 dans l'eau distillée donne dans tous les cas une suspension très homogène, très fine et à sédimentation lente. Il y a très bonne dispersion de la partie argilo-humique, qui est totale dans presque tous les cas. De plus, le sédiment prend un aspect lavé. Enfin, au bout de vingt-quatre heures le sédiment est deux fois plus épais qu'en eau minéralisée et souvent plus épais qu'en eau distillée, ce qui prouve la grande finesse de ses constituants.

5° L'eau distillée paraît un bon dispersant, cependant moins général que le pyrophosphate. L'un et l'autre ne semblent pas agir sur les mêmes éléments du sol, ce qui est connu pour l'humus [4]. Nous allons voir qu'il est possible de mettre à profit les propriétés de l'un et de l'autre.

II. — CHOIX DU MILIEU DISPERSANT.

On sait que les statisticiens s'accordent pour dire qu'on ne peut faire de dilutions valables d'une suspension quelconque que si celle-ci est « randomisée », c'est-à-dire si tous ses constituants sont distribués au hasard dans le milieu dispersant. Théoriquement, on a le choix entre le maintien de la microstructure tout

au long des dilutions, ou au contraire la destruction de la structure dans les premières dilutions et le maintien de cette dispersion dans les dilutions suivantes. Dans les deux cas on aura des dilutions homogènes, du moins théoriquement.

a) MAINTIEN DE LA MICROSTRUCTURE. — Nous avons vu dans notre précédente note [1] que c'est la dilution des ions minéraux au cours des dilutions (en eau distillée) qui était responsable de la défloculation des complexes argilo-humiques. Il est donc théoriquement possible d'empêcher cette défloculation en effectuant les dilutions dans une eau minéralisée.

Si cette méthode convient dans certains cas, elle présente en réalité des inconvénients : elle peut produire la floculation artificielle de suspensions de certaines terres justement peu floculées, comme c'est le cas pour la terre de jardin peu humifère, utilisée ci-dessus au cours des essais de sédimentation en différents milieux dispersants. En outre, pour les terres très floculées, il semble bien qu'il ne soit pas possible d'éviter toute dispersion même en milieu très minéralisé. En effet, les numérations faites (voir plus loin) en eau de rivière, comparativement à celles effectuées en eau distillée ou en pyrophosphate de sodium à 1 p. 1 000, donnent des chiffres trop élevés par rapport à ce qu'on attend. S'il n'y avait pas eu de dispersion, le résultat en eau de rivière devrait être plus bas.

Donc le maintien de la microstructure au cours des dilutions nous paraît difficile à réaliser dans tous les cas, peut-être simplement parce que l'agitation produite au cours des dilutions suffit pour provoquer une certaine fragmentation, sans qu'il y ait pour autant de dispersion vraie, c'est-à-dire de défloculation. L'incertitude du degré de dispersion constitue donc un facteur d'erreurs non négligeable et l'homogénéité des dilutions faites en eau minéralisée reste aléatoire. Quoi qu'il en soit d'ailleurs, le résultat de la numération aura tendance à être obtenu par défaut, et ceci sans gain du côté de la fidélité des mesures.

b) DESTRUCTION DE LA MICROSTRUCTURE. — Si le maintien de la microstructure paraît peu satisfaisant, nous nous sommes demandé si sa destruction ne serait pas préférable.

Au cours de notre étude, ci-dessus, des divers milieux dispersants, nous avons vu que l'eau distillée provoque une bonne désagrégation des complexes argilo-humiques dans un bon nombre de cas, mais qu'elle n'était pas totale dans les autres. Aussi avons-nous cherché une substance non nuisible pour les germes, et qui aurait une bonne action dispersante. Dommergues [2], au cours de numérations des ferrobactéries, a proposé l'emploi du

pyrophosphate de sodium à 1 p. 1 000 dans l'eau distillée comme milieu dispersant.

Nous avons vu qu'en effet c'est le pyrophosphate à 1 p. 1 000 qui donne dans tous les cas une suspension très homogène, très fine, et à sédimentation lente. Son action est très profonde, puisque le sédiment immédiat (quinze à trente minutes) apparaît comme lavé. Si les numérations faites après dilution en pyrophosphate, comparées à celles faites en eau distillée, ne donnent pas toujours de grandes différences (voir plus loin) et si beaucoup de terres sont suffisamment bien dispersées par l'eau distillée seule, nous effectuons néanmoins les dilutions en pyrophosphate de sodium à 1 p. 1 000, à cause de son action plus profonde et surtout plus constante, quelle que soit la nature des terres. Ceci évite d'avoir à faire des discriminations plus ou moins aléatoires entre les terres pour savoir quel milieu dispersant employer.

En outre, comme nous effectuons seulement les dilutions 10^{-1} à 10^{-3} en pyrophosphate et les suivantes en eau distillée, on cumule ainsi les actions dispersantes des deux milieux. En effet, il est très probable que l'eau distillée agit sur des éléments telluriques différents de ceux sur lesquels agit le pyrophosphate. D'autre part, l'eau distillée n'ayant pas d'activité floculante, l'action dispersante du pyrophosphate sera maintenue aux dilutions suivantes.

Pour être complet, remarquons encore qu'il existe quelques rares amas bactériens très enrobés dans les gouttelettes de mucus et visibles au microscope, qui échappent à l'action du pyrophosphate et de l'eau distillée. Mais leur nombre est petit en regard de la flore totale et nous pensons que l'erreur commise à cause de ces petits amas (au plus 5 à 10 germes par amas) est négligeable.

Nous croyons donc qu'il est préférable de détruire la microstructure pour faire des numérations de la flore totale, ce qui d'ailleurs est le seul moyen de dénombrer la totalité des germes présents.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Nous avons fait porter nos numérations sur trois groupes de terres : des terres acides, des terres neutres et des terres alcalines. Les résultats obtenus sont les suivants :

1° POUR LES TERRES ACIDES. — Les résultats des numérations pour ce type de terre montrent que la nature du milieu dispersant n'a pas beaucoup d'importance. Le nombre de germes trouvés est identique, que les dilutions soient faites en eau minéralisée,

en eau distillée ou en pyrophosphate. A titre d'exemple, nous donnons les chiffres obtenus avec un mor : en eau de rivière on a trouvé $3,8.10^6$ germes, en eau distillée et en pyrophosphate $3,9.10^6$ (cette différence n'est pas significative).

2° POUR LES TERRES NEUTRES. — Pour ce type de terre, les différences les plus nettes se rencontrent pour celles contenant le plus d'humus.

Dans une terre à blé de la région parisienne peu humifère, nous avons trouvé une différence significative entre les résultats des numérations faites en eau de rivière (36.10^6 germes) et en eau distillée (63.10^6 germes), et une différence non significative entre les résultats obtenus en eau distillée et en pyrophosphate (66.10^6 germes).

Pour une terre de jardin très humifère, nous avons obtenu en eau de rivière 85.10^6 germes, en eau distillée 63.10^6 (différence à la limite de la signification), mais par contre 385.10^6 en pyrophosphate.

Pour un mull de pelouse nous avons eu des différences significatives dans les trois cas : 23.10^6 en eau de rivière, 65.10^6 en eau distillée, 145.10^6 en pyrophosphate.

3° POUR LES TERRES ALCALINES. — Ici encore, il semble que ce soit par rapport à l'humus que l'action du pyrophosphate soit la plus nette.

Pour une rendzine grise peu humifère, nous n'avons pas eu de différences significatives entre l'eau distillée (36.10^6 germes) et le pyrophosphate (41.10^6 germes) d'une part, l'eau de rivière (28.10^6 germes) d'autre part, la différence entre l'eau de rivière et le pyrophosphate étant à la limite de la signification.

Pour une rendzine brune, plus humifère que la précédente, nous avons eu 364.10^6 germes en eau de rivière, 525.10^6 en eau distillée et 722.10^6 en pyrophosphate.

La méthode ayant permis de réaliser ces numérations est une technique en milieu liquide dite « numération cinétique » [3] qui sera publiée sous peu. Nous donnerons en outre son étude statistique, ce qui nous permettra d'ailleurs d'apporter de nouveaux arguments en faveur du pyrophosphate de sodium à 1 p. 1 000 dans l'eau distillée comme milieu de dispersion.

IV. — RÔLE DES PIPETTES.

Nous avons également souligné, dans notre précédente note, l'effet perturbateur des pipettes ; nous avons montré que c'étaient les éléments colloïdaux fins qui, s'absorbant sur les parois des pipettes, produisaient par rapport aux éléments plus grossiers

un véritable effet de ségrégation, la partie colloïdale fixée sur les parois se trouvant perdue pour la numération.

Nous avons pensé, pour remédier à ce phénomène gênant, à employer des pipettes siliconées [Si 200 (1), en solution à 2 p. 100 dans le benzène]. Les pipettes, parfaitement propres, une fois enduites sont cuites une heure à 300° après un séchage à l'étuve à 100°.

On peut également employer l'enduit par le Rhodorsil 240 (2) en solution à 2 p. 100 dans l'éther anhydre, suivi d'un séchage à 100° ; on laisse ensuite à l'air quelques heures, puis on lave abondamment à l'eau distillée ; avec ce dernier silicone il est prudent de recommencer le traitement avant chaque stérilisation.

Dès lors les pipettes ne se laissent plus mouiller et ne retiennent plus de complexe argilo-humique. Il est même à la rigueur possible d'utiliser une seule pipette ainsi préparée pour réaliser les dilutions. On obtient ainsi des résultats satisfaisants sur milieu solide, mais sur milieu liquide on peut craindre un résultat par excès.

De toutes ces constatations nous avons déduit la technique suivante.

V. — TECHNIQUE DE DILUTION.

Broyer, dans son état d'humidité naturelle, 1 g de terre jusqu'à homogénéisation très complète. Ajouter 9 ml d'une solution de pyrophosphate de sodium à 1 p. 1 000 dans l'eau distillée, stérilisée à 110° pendant vingt à trente minutes à l'autoclave (on ne peut stériliser deux fois cette solution sans l'altérer). Broyer de nouveau, laisser déposer ; décanter jusqu'à la dernière goutte. Broyer le sédiment très longuement (au moins cinq minutes) et émulsionner dans la partie précédemment décantée. On a ainsi la suspension de départ, c'est-à-dire la dilution 10^{-1} .

Les dilutions 10^{-2} à 10^{-3} seront également faites en pyrophosphate de sodium à 1 p. 1 000, les dilutions suivantes étant faites en eau distillée ; il est recommandé d'attendre une à deux heures, en agitant la dilution 10^{-3} de temps en temps, avant de passer aux suivantes : la dispersion sera plus totale. On changera de pipette à chaque dilution (en employant des pipettes siliconées de préférence, et en opérant si possible en tubes paraffinés). On prendra soin, à chaque dilution, de bien laver les pipettes dans l'eau de dilution par plusieurs aspirations-soufflages, de manière à récupérer le plus possible les germes fixés sur les parois des pipettes.

(1) Il s'agit de silicone de Saint-Gobain Si 200, 350 cstks.

(2) Il s'agit du Rhodorsil 240 de Prolabo.

VI. — CONSÉQUENCES DE LA MÉTHODE.

D'après ce que nous venons de voir, l'avantage de la méthode que nous proposons consiste essentiellement dans l'homogénéité des dilutions. Ce point est particulièrement important, puisque c'est la principale condition qui autorise à faire des dilutions.

a) POUR LES MILIEUX SOLIDES. — Sur milieu solide on devait théoriquement obtenir, avec la technique proposée, des dénombrements de colonies qui soient exactement proportionnels; en fait, c'est ce qu'on obtient avec certaines terres, en particulier avec les sols acides, mais avec les autres il n'en est pas de même. Nous ne pensons pas que ce soit dû à un défaut de répartition au cours des dilutions, puisque la méthode évite justement cet inconvénient; nous pensons plutôt qu'il existe une concurrence entre colonies lorsque ces dernières sont trop nombreuses.

En effet, si à l'aide d'une même dilution et d'une même pipette on ensemence 0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml de cette dilution dans des boîtes de Petri contenant de la gélose-extrait de terre, on obtient les résultats suivants :

Pour 0,2 ml d'ensemencement il y a 158 colonies.

Pour 0,5 ml d'ensemencement il y a 290 colonies.

Pour 1 ml d'ensemencement il y a 418 colonies.

En ramenant les résultats à 1 ml de la dilution choisie, on a les résultats suivants :

Pour les boîtesensemencées avec 0,2 ml on a 790 germes.

Pour les boîtesensemencées avec 0,5 ml on a 580 germes.

Pour les boîtesensemencées avec 1 ml on a 418 germes.

Tous ces chiffres devraient être les mêmes s'il n'y avait pas de concurrence entre germes; comme ici il s'agit de la même suspension, il ne peut donc être question de l'homogénéité des dilutions et les résultats obtenus montrent que le nombre de colonies trouvées dépend de la concurrence. Ce fait explique donc aisément des résultats tels que celui-ci, obtenu avec une terre de jardin :

123 colonies à la dilution 10^{-5} .

18,4 colonies à la dilution 10^{-6} .

On est donc conduit, en milieu solide, à faire la moyenne des boîtes ayant donné les chiffres les plus bas possible : moins de 20 par exemple. Mais dans ce cas la précision diminue beaucoup et il faudrait faire au moins 10 à 20 boîtes par dilution.

b) POUR LES MILIEUX LIQUIDES. — La numération en milieu liquide consiste à ensemer des dilutions de terre dans des tubes contenant un milieu de culture adéquat (plusieurs tubes par dilution). On détermine le niveau moyen de dilution atteint par les tubes positifs, et à l'aide des tables de Fischer on calcule le nombre de germes.

En somme, ce procédé de numération est basé sur la manière dont se répartissent les germes au voisinage de la dilution limite. C'est donc sur les toutes dernières dilutions contenant encore des germes que la numération est faite. Or, ce principe n'est utilisable que si les répartitions des germes dans les dilutions sont homogènes. Cette condition est absolument indispensable pour qu'une numération en milieu liquide ait un sens. Remarquons enfin que, dans ce cas, le phénomène de concurrence ne peut plus jouer, ce qui est un avantage, puisqu'il n'est plus question que de noter seulement la présence ou l'absence de culture sans chercher à savoir si elle est le fait d'un ou plusieurs germes.

A l'aide de la méthode de dilution que nous venons de proposer, il devient donc possible de faire des numérations en milieu liquide puisqu'elles se révèlent donner des répartitions homogènes à partir d'une suspension mère « randomisée ».

Dans une note ultérieure nous donnerons tous les détails permettant d'effectuer des numérations de la flore totale en milieu liquide, en utilisant cette méthode de dilution. Elle nous a donné des résultats d'une bonne précision et d'une bonne fidélité [3]. L'analyse statistique que nous ferons alors des résultats sera encore la meilleure démonstration de l'homogénéité des suspensions obtenues par la méthode que nous proposons ici.

CONCLUSION.

Le broyage soigné de la terre en présence de pyrophosphate de sodium à 1 p. 1 000 a permis d'obtenir des suspensions très homogènes et de réaliser des dilutions régulières permettant l'emploi des milieux liquides pour l'analyse bactériologique des sols et la numération de leur flore totale en milieu liquide.

SUMMARY

ENUMERATION OF TOTAL MICROFLORA AND MICROSTRUCTURE OF SOILS.

II. — PRACTICAL CONSEQUENCES.

By means of a careful grinding of loam in the presence of 1 p. 1 000 sodium pyrophosphate, it is possible to obtain very homogeneous suspensions and to realize regular dilutions. This

technique allows the use of liquid media for the bacteriological analysis of soils and enumeration of their total flora in liquid medium.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LAVERGNE (D.) et AUGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 447.
 - [2] DOMMERGUES. VI^e Congrès international de la Science du Sol.
Volume des suppléments (sous presse).
 - [3] AUGIER (J.) et LAVERGNE (D.). *Ann. Inst. Pasteur* (à paraître).
 - [4] DUCHAUFOUR. *Pédologie, applications forestières et agricoles*, 1956.
-

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e)

Séance du 3 Avril 1958

Présidence de M. PRÉVOT.

COMMUNICATIONS

ÉTUDE SUR *ACHROMOBACTER DESMOLYTICUS* ISOLÉ D'UN ÉLEVAGE DE GRENOUILLES

par J. BRISOU (*), G. TYSSET et B. VACHER.

(Section technique de l'Armée
et Institut Pasteur, Service des Anaérobies)

Gray et Thornton ont fait connaître en 1928 deux germes voisins qu'ils isolèrent du sol et du fumier de cheval. Ils les appelèrent *Pseudomonas rathonis* et *Pseudomonas desmolytica*.

Ces bactéries furent ensuite décrites dans le *Bergey's Manual* sous les noms d'*Achromobacter rathonis* et *Achromobacter desmolyticus*, plus corrects puisqu'il ne s'agit pas d'espèces chromogènes à pigments fluorescents, bleus, verts ou rougeâtres.

Les éditions de 1948 et de 1957 [1] du manuel américain considèrent cependant à nouveau ces bactéries comme des *Pseudomonas*. Dans la systématique française, on retient le terme *Achromobacter*.

Quoi qu'il en soit, les microbes que nous présentons aujourd'hui furent isolés par hémoculture en bouillon nutritif du sang du cœur de grenouilles mortes d'une maladie septicémique. Ces grenouilles, importées de Yougoslavie, présentaient des phlyctènes sans purpura dans la région ventrale et sur la partie inférieure des cuisses. Après une incubation de vingt-quatre heures à 37°, l'isolement classique sur gélose fut pratiqué. On obtint deux sortes de colonies microbiennes :

a) Des colonies de 2 mm de diamètre, poussant rapidement avec centre opaque, granuleux, jaune paille et un halo clair ; elles correspondaient à un *Flavobacterium hydrophilum*.

(*) Adresse de l'auteur : 15, rue Alsace-Lorraine, Poitiers (Vienne).

b) Des colonies punctiformes, difficilement visibles à l'œil nu en trente-six heures, à bord régulier, de consistance homogène, incolores par transparence. Les germes correspondants font l'objet de notre travail.

Ces petites colonies, repiquées sur gélose ordinaire, donnèrent naissance à des enduits plus abondants et à des cultures normales en milieux liquides. Il devint donc aisé de pratiquer l'identification du microbe par les méthodes usuelles.

MORPHOLOGIE. — Bâtonnets à extrémités arrondies, mobiles grâce à une ciliature unipolaire. Pas de formes incurvées. Ni spores, ni capsules. Gram-négatifs. Dimensions : 2 à 2,5 μ $\times$ 0,8 μ ; longueur des flagelles : 3 à 4 μ .

CONDITIONS DE CULTURE. — Microbes aérobies préférentiels, anaérobies facultatifs. Ils croissent entre + 4° C et 40° C. Optimum de croissance : 30° C à pH 7,2. Les pH extrêmes se situent entre 5 et 9.

Croissent d'abord lentement sur les milieux usuels, mais s'adaptent assez rapidement.

Gélose : enduit transparent, puis grisâtre, peu épais. Aucun pigment. Développement plus rapide et plus abondant si le milieu est enrichi d'extrait globulaire, d'ascite, de sérum. Gélatine : pas de liquéfaction. Pas d'action sur le blanc d'œuf coagulé. Lait tournesolé : alcalinisé en quarante-huit heures. Lait au bleu de méthylène : réduction. Culture facile sur l'eau peptonée. Sur les milieux liquides peptonés : voile léger, très fragile. Bouillon végétal : trouble homogène, ni voile, ni anneau, dépôt vers le troisième jour. Aucune odeur, ni pigment.

Pomme de terre : culture en trainée de limace.

Gélose au sang de grenouille : pas d'hémolyse.

En présence de KCN : culture en vingt-quatre heures.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES. — Ni indole, ni SH₂. Nitrates réduits en nitrites. Rouge neutre inchangé. R. M. et V. P. : négatives. Absence d'uréolyse en milieu synthétique de Ferguson-Hook. Le citrate de soude est alcalinisé en vingt-quatre heures à cinq jours selon les souches.

Pouvoir glucidolytique peu marqué : lactose, xylose, arabinose, adonitol, rhamnose, dulcitol, maltose, saccharose, inositol, salicine, amidon, ne sont pas acidifiés. Seuls le glucose et le glycérol sont lentement attaqués, le glucose du reste irrégulièrement. La cellulose n'est pas attaquée. La lécithine n'est pas touchée.

Les germes poussent en milieu minéral additionné de nitrate d'ammonium et de glucose, en présence de pétrole lampant, d'alcool méthylique, éthylique et de xylol. Ils n'utilisent pas, ou mal, les alcools propylique et butylique.

RÉSISTANCE A LA CHALEUR, AUX ANTISEPTIQUES ET AUX ANTIBIOTIQUES. — Germes tués en une minute à 80° ; quatre minutes à 60° ; cinq minutes à 56°.

Sensibles aux antiseptiques usuels et à quelques antibiotiques.

POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL. — A. Poissons : *Carassius auratus* (carassin), *Tinca vulgaris* (tanche), *Phoxinus phoxinus* (vairon) et *Gasterosteus aculeatus* (épine de mer) résistent à l'inoculation intra-abdominale de suspension microbienne.

B. Batraciens : *Pleurodeles waltlii* (pleurodèle), *Triturus marmoratus* (triton marbré), *Rana esculenta* (grenouille commune), *Xenopus laevis* (crapaud du Cap), sont également réfractaires à l'inoculation.

C. Reptiles : *Natrix natrix* (couleuvre à collier), *Natrix viperinus* (couleuvre vipérine), insensibles.

D. Mammifères : Souris, rats et cobayes n'ont présenté aucune gêne locale ou générale à la suite d'inoculation de suspensions microbiennes.

Les bactéries étudiées se sont donc montrées totalement dépourvues de pouvoir pathogène pour les animaux mis en expérience.

POSITION TAXONOMIQUE. — L'absence de chromogénèse, la mobilité, orientent vers le genre *Achromobacter*. Un sucre ou deux sont faiblement et lentement acidifiés. Il n'y a pas de dégagement gazeux. Le germe réduit les nitrates en nitrites, il n'est pas protéolytique.

Deux alternatives s'offrent à nous lorsque l'on consulte la liste des *Achromobacter* récemment révisée par l'un de nous [2, 3] : *Achromobacter rathonis* et *Achromobacter desmolyticus*, dont nous avons rappelé l'historique au début de cette note. L'espèce *rathonis* attaque l'amidon ; le type *desmolyticus*, comme nos bactéries, reste indifférent à ce glucide. C'est donc à ce dernier que nous avons songé pour identifier les germes isolés des grenouilles. Nous avons pu, grâce à l'étude de plusieurs souches, compléter les caractères culturels insuffisamment connus jusqu'ici.

On a pu voir également que la bactérie était dépourvue de pouvoir pathogène et qu'elle n'avait pris aucune part à la maladie septicémique des grenouilles dont seul *Flavobacterium hydrophilum* fut considéré comme responsable.

SUMMARY

STUDIES ON *Achromobacter desmolyticus* ISOLATED FROM A BREEDING OF FROGS.

The authors describe in details *A. desmolyticus* isolated from a breeding of frogs. The germ was associated with *Flavobacterium hydrophilum*, agent of a « red leg » epizootic. The biochemical properties of *A. desmolyticus* are described and its innocuity is demonstrated by inoculations into different warm- and cold-blooded animals. This description is followed by a short taxonomic discussion.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERGEY. *Manual of determinative bacteriology*, 6^e édit., 1948, et 7^e édit., 1957.
- [2] BRISOU (J.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 722.
- [3] BRISOU (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 397.

LES STREPTOCOQUES FÉCAUX DES INTESTINS HUMAINS ET ANIMAUX

par R. BUTTIAUX.

(Institut Pasteur de Lille)

Des travaux anglais ont, depuis quelques années, attiré à nouveau l'attention sur la répartition des diverses espèces de streptocoques du groupe D dans les fèces de l'homme et des animaux. Après les premières recherches d'Orla Jensen [1], Barnes et Ingram [2], puis Barnes et coll. [3] signalent que *St. faecalis*, espèce dominante de l'intestin humain, n'existe pas dans celui du porc qui héberge surtout *St. faecium* individualisé par Orla Jensen. Cooper et Ramadan [4], de même, trouvent *St. faecalis* seulement chez l'homme et ne le rencontrent pas chez les bovins et ovins.

Ces constatations ne concordaient pas avec celles de notre expérience courante. Nous avons donc étudié plus rationnellement la question en tirant profit de l'excellent milieu mis au point par Barnes [5]. Il permet une facile distinction initiale entre *St. faecalis* et ses variétés *zymogenes* et *liquefaciens*, d'une part, et *St. faecium*, *durans* et *bovis* de l'autre. Barnes [6] a montré, en effet, que les premiers réduisaient le triphényl-tétrazolum et que les seconds en étaient incapables.

MATIÈRES FÉCALES ÉTUDIÉES. — a) 119 selles humaines ont été examinées. Soixante-douze proviennent de nourrissons sains ou malades âgés de 1 à 12 mois. Tous étaient soumis à l'allaitement artificiel au lait de vache. Les selles ont été recueillies par écouvillonnage rectal. Neuf ont été prélevées dans les mêmes conditions chez des enfants âgés de 5 à 7 ans, recevant une alimentation mixte avec du lait de vache. Trente-huit, enfin, proviennent d'adultes sains ou malades ; ces matières fécales ont été recueillies dans des récipients stériles.

Tous ces sujets habitaient le Nord de la France.

b) 52 matières fécales de porcs, 32 de vaches et 24 de moutons, provenant d'animaux différents, ont également été étudiées. Elles étaient prélevées par écouvillonnage rectal aussitôt après l'abat dans un abattoir industriel de Lille.

TECHNIQUE. — Les échantillons ont été analysés dans les six heures suivant leur recueil. Après émulsion dense dans de l'eau peptonée, 0,1 ml de la suspension était étalée à la surface d'un milieu de Barnes coulé en boîte de Petri. 1 ml de la même suspension était inoculé d'autre part sur un milieu de Rosenow [7] favorable à l'enrichissement des streptocoques ; après vingt-quatre et quarante-huit heures

d'incubation à 37° une anse bouclée de celui-ci était reportée sur le même milieu de Barnes dont voici la composition :

Peptone (Evans) : 10 g ; extrait de viande de bœuf : 10 g ; acétate de thallium : 1 g ; chlorure de 2, 3, 5 triphényl-tétrazolium : 0,1 g ; glucose : 10 g ; agar (Difco) : 15 g ; eau distillée : 1 000 ml.

Il a été préparé selon les directives de son auteur [5] et rigoureusement ajusté à pH 6.

Dans ces conditions, *St. faecalis* et ses variétés *zymogenes* et *liquefaciens* donnent des colonies à centre rouge franc entouré d'un liséré blanchâtre ; les colonies de *St. faecium*, *durans* et *bovis* sont entièrement blanches ou faiblement rosées ; celles des streptocoques lactiques sont de couleur rouge foncé et leur surface est entièrement colorée sans bordure blanchâtre ; cet aspect particulier les rend facilement reconnaissables.

Plusieurs représentants de chaque type de colonies ont été soumis à un second isolement sur milieu de Barnes, puis finalement repiqués sur gélose à la tryptose (Difco) + glucose + extrait de levures. Les souches obtenues ont été soumises à une étude biochimique détaillée [8]. En utilisant la technique modifiée de Shattock [9] nous nous sommes assurés que celles possédant les caractères principaux des espèces ou variétés de streptocoques fécaux appartenaient bien au groupe D de Lancefield.

Volontairement, nous n'avons pas subdivisé les espèces en types biochimiques. Cette façon de faire [10] compliquerait inutilement le problème qui est le sujet de ce travail.

RÉSULTATS. — Ils sont résumés dans le tableau I. Nous avons envisagé la seule répartition qualitative et ne signalons pas les propor-

	Hommes						Animaux					
	Nourrissons		Enfants		Adultes		Porcs		Vaches		Moutons	
	T	%	T	%	T	%	T	%	T	%	T	%
Selles examinées	72		9		38		52		32		24	
Selles avec Strepto. D	72	100	9	100	38	100	52	100	21	65,6	21	87,5
<i>Strp. faecalis</i>	45		4		22		10		3		2	
<i>Strp. zymogenes</i>	2	70,3	0		4	73,6	0	53,5	0	14,2	0	14,2
<i>Strp. liquefaciens</i>	4		0		2		18		0		1	
<i>Strp. faecium</i>	49	68	9		35	92,1	48	92,3	17	80,9	21	100
<i>Strp. bovis</i>	11	15,2	1		4	10,5	3	5,7	7	33,3	1	4,7
<i>Strp. faecalis</i> + <i>Strp. faecium</i>	31	43	1		14	36,8	6		0		0	
<i>Strp. faecium</i> + <i>Strp. liquefaciens</i>	3		0		2		15	28,8	0		0	
Strepto. lactiques	0		5		7		0		23		10	

tions des diverses espèces rencontrées dans la même selle. Nous y reviendrons par ailleurs, car cet aspect de la question semble présenter, chez l'homme, un intérêt d'ordre médical.

La lecture du tableau I entraîne les déductions suivantes :

1° Toutes les fèces d'hommes, nourrissons, enfants et adultes contiennent des streptocoques fécaux. Ceux-ci sont également constants chez le porc, mais ne le sont pas chez la vache et le mouton. Quand ils sont absents chez ces derniers, les seuls streptocoques trouvés appartiennent au groupe lactique (onze fois sur trente-deux chez la vache et trois fois sur vingt-quatre chez le mouton).

2° En négligeant les selles d'enfants de 5 à 7 ans, dont le nombre est insuffisant pour permettre des conclusions valables, et en tenant compte des fèces animales contenant un streptocoque fécal, nous remarquons :

St. faecalis et ses variétés sont plus fréquents dans les matières fécales humaines que dans celles des animaux. On les trouve dans 53,8 p. 100 des intestins de porc, mais la variété *liquefaciens* y est particulièrement répandue. On les rencontre beaucoup plus rarement chez la vache, comme nous l'avions déjà remarqué [41], et chez le mouton.

St. faecium est constant chez le mouton, fréquent ou très fréquent chez la vache et le porc, mais il l'est aussi chez le nourrisson (68 p. 100) et l'adulte (92,1 p. 100). On ne peut pas le considérer comme un hôte exclusif des intestins animaux. Cette conclusion y est confirmée par le travail de Guthof [42] en Allemagne ; cet auteur isole *St. faecalis* seul dans les selles de nourrissons au lait maternel, mais trouve *St. faecium* chez de très nombreux enfants et adultes.

Quand *St. faecalis* (ou ses variétés) est présent chez l'animal, il est toujours quantitativement moins abondant que les autres espèces, mais nous l'avons rencontré pourtant comme seul représentant des streptocoques fécaux dans les selles de 3 porcs et 1 mouton.

St. faecium est souvent moins abondant que *St. faecalis* chez l'homme, mais on peut le trouver seul ; ce phénomène a été observé dix fois sur soixante-douze chez le nourrisson, trois fois sur neuf chez l'enfant et sept fois sur trente-huit chez l'adulte.

3° *St. bovis* est surtout fréquent chez la vache ; il se rencontre parfois chez le nourrisson (15,2 p. 100) et l'homme adulte (10,5 p. 100). Il est rare chez le porc et le mouton (5 p. 100). Nos constatations diffèrent à ce sujet de celles de Raibaud et Caulet [43] qui trouvent *St. bovis* dominant dans l'intestin des porcins.

4° Des associations entre les différentes espèces sont fréquentes. Deux d'entre elles sont plus particulièrement répandues : *St. faecalis* + *St. faecium* chez l'homme et *St. faecium* + *St. liquefaciens* chez le porc.

En retenant les travaux antérieurs et celui-ci on s'aperçoit que *St. faecium* est le plus répandu dans l'ensemble des espèces animales et humaine. On comprend ainsi sa plus grande fréquence dans les produits soumis à des souillures fécales. Dans les eaux de puits [44] nous l'avons trouvé 3,2 fois plus souvent que *St. faecalis* ; de même dans des aliments variés, laits, charcuteries, gélatines, nous l'avons isolé quatre fois plus que ce dernier. Ceci, à notre avis, n'enlève rien à son individualité qui est certaine.

CONCLUSIONS. — Les travaux anglais semblaient avoir mis en évidence un phénomène utile pour l'hygiéniste. D'après l'espèce du streptocoque fécal rencontré dans un produit souillé on aurait pu déduire l'origine humaine ou animale de la contamination. Nos recherches, dans la région et dans les conditions où elles ont été effectuées, infirment malheureusement cette hypothèse. Nous avons trouvé *St. faecalis* dans l'intestin des animaux et *St. faecium* est fréquent dans celui de l'homme. Ces constatations ne sauraient diminuer la valeur des recherches de Barnes et Ingram dont nous connaissons et estimons la rigueur. Il faut donc admettre un facteur régional dans cette répartition des streptocoques D. Il n'est pas exceptionnel dans ces questions de flore intestinale, dépendant manifestement du mode d'alimentation et de nombreuses autres conditions. Il explique les discordances observées dans nos propres travaux. Lors de l'étude de matières fécales de vaches stabulant dans des fermes modèles et soumises à une alimentation équilibrée et surveillée [41] nous n'avons jamais trouvé *St. faecalis* ; dans celles examinées ici et provenant de vaches de régions différentes, recevant des alimentations variées, nous l'isolons pourtant dans 14,2 p. 100 des cas. Les mêmes facteurs expliquent vraisemblablement les discordances des résultats de Barnes et Ingram, de Raibaud et Caulet et des nôtres quant à la présence de *St. bovis* dans l'intestin du porc. Ces divergences nous montrent que, dans cet ordre de choses, des interprétations paraissant évidentes dans une région déterminée ne doivent pas être généralisées sans étude préalable. Il en est ainsi, d'ailleurs, pour toutes les constatations bactériologiques applicables à l'hygiène.

SUMMARY

FECAL STREPTOCOCCI OF HUMAN AND ANIMAL INTESTINES.

By means of Barnes' medium, feces of human beings (119) of different ages, and of animals (52 samples from swine, cows and sheep) have been examined for the presence of the various streptococci species.

Fecal streptococci are always present in man and swine, not in cows and sheep. *Str. faecalis* and its variants are more frequent in man than in animals, but do exist in animals. *Str. faecium* is always present in sheep ; it is frequent in cows, swine and also in man.

These findings differ from those of the English workers. They are due to a distribution of various D streptococci according to the regions or countries, which is not the same as that of the countries studied by the English workers.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ORLA JENSEN (S.). *Die echten Milchsäurebakterien. Ergänzungsband*, Copenhagen, 1943.
- [2] BARNES (E. M.) et INGRAM (M.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1955, **7**, 115.
- [3] BARNES (E. M.), INGRAM (M.) et INGRAM (G. C.). *J. appl. Bact.*, 1956, **49**, 204.
- [4] COOPER (K. E.) et RAMADAN (F. M.). *J. gen. Microbiol.*, 1955, **42**, 180.

- [5] BARNES (E. M.). *J. appl. Bact.*, 1956, **49**, 193.
- [6] BARNES (E. M.). *J. gen. Microbiol.*, 1956, **44**, 57.
- [7] BUTTIAUX (R.) et FLAMENT (J.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1951, **4**, 145.
- [8] SHATTOCK (P. M. F.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1955, **7**, 95
- [9] SHATTOCK (P. M. F.). *J. gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 80.
- [10] FEWINS (B. G.), NEWLAND (L. G.) et BRIGGS (C. A. E.). *J. appl. Bact.*, 1957, **20**, 234.
- [11] WILSSENS (A.) et BUTTIAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 332.
- [12] GUTHOF (O.). *Zbl. Bakt. I.*, 1957, **70**, 327.
- [13] RAIBAUD (P.) et CAULET (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 1291.
- [14] BUTTIAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur (sous presse)*.

CINQ NOUVEAUX SÉROTYPES D'ARIZONA

**(1,4 : 26-25 ; 9 : 29-31 ; 10 : 1,2,5,6 ; 19 : 22-31 ;
ET 20 : 24-21) ISOLÉS DE REPTILES**

par P. R. EDWARDS, Mary A. FIFE, L. LE MINOR et L. CHAMBON.

(Communicable Disease Center, Public Health Service,
U. S. Department of Health, Education and Welfare,
Atlanta, Georgia, et Instituts Pasteur de Paris et de Saigon)

Les 5 sérotypes décrits ont été isolés de selles de serpents apparemment normaux. A l'exception d'un sérotype (9 : 29-31) qui a été isolé à partir d'un *Ancistrodon* à Saigon, Viet-Nam, tous proviennent de vipères et couleuvres capturées en France. A part les exceptions notées ci-dessous dans les descriptions des sérotypes, toutes les cultures présentent les caractères biochimiques typiques du groupe *Arizona* et font fermenter le lactose après vingt-quatre heures d'incubation.

129-57 (1,4 : 26-25) est représenté par une seule culture. Les sérotypes connus 12 : 27-28 et 21 : 23-25 ont été trouvés chez le même animal. Cette souche est agglutinée au titre du sérum O préparé à partir de la souche-type du groupe O : 1,4. Au cours de l'épreuve d'absorption les agglutinines pour la souche homologue sont presque, mais non totalement saturées. Cependant, la culture épuise complètement les agglutinines O d'un sérum préparé à partir du sérotype 1,4 : 33-31 (Edwards, Kauffmann et Fain, 1953). Les antigènes H sont diphasiques. La phase 1 est agglutinée au titre et sature toutes les agglutinines du sérum Arizona H : 26. Les antigènes H de la phase 2 sont identiques à ceux de la phase 2 de la souche-type H : 25.

Aucun des antigènes de cette culture n'a de rapports marqués avec les antigènes O ou H des *Salmonella* connues, contrairement aux antigènes de la majorité des *Arizona* diphasiques.

299-57 (9 : 29-31) était aussi représenté par une seule culture. Aucun autre sérotype n'a été isolé du reptile qui l'hébergeait. Le groupe

Arizona O : 9 est divisible en deux sous-groupes : 9a,9b et 9a,9c. La culture 299-57 est agglutinée par le sérum 9b saturé, mais pas par le sérum 9c. Dans les épreuves d'absorption cette souche sature toutes les agglutinines du sérum O : 9a,9b. L'antigène H est diphasique. La phase 1 est agglutinée au titre du sérum *Arizona* H : 29 et en sature toutes les agglutinines. De même, la phase 2 sature toutes les agglutinines du sérum *Arizona* H : 31. Les antigènes O de cette souche sont en rapport avec l'antigène O : 50 des *Salmonella*, qui est identique à l'antigène O : 9a,9c *Arizona*. La phase 1 est en rapport avec l'antigène H : k des *Salmonella*, tandis que la phase 2 est très proche de l'antigène H : z des *Salmonella*.

151-57 (10 : 1,2,5,6) est représenté par deux cultures isolées d'une même couleuvre. Les sérotypes déjà connus 12 : 27-28 et 25 : 23-30 étaient aussi présents chez ce reptile. La culture 151-57 ne fermente pas le lactose et cultive dans le milieu KCN de Moeller. Le groupe *Arizona* O : 10 est divisible en deux sous-groupes : 10a,10b et 10a,10c. 151-57 est agglutiné fortement par le sérum 10c saturé, mais pas par le sérum 10b. Dans les épreuves d'absorption du sérum O : 10a,10c par 151-57 toutes les agglutinines sont saturées. L'antigène H est monophasique et la culture agglutinée fortement par tous les sérums *Arizona* H contenant des agglutinines 1,2... En recherchant l'agglutination dans les sérums saturés anti-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 36, on voit qu'elle se produit seulement dans les sérums anti-2, 5 et 6. La culture est agglutinée au titre du sérum H : 1,2,5,6. Lors de l'épreuve d'absorption le titre homologue baisse de 1/20 000 à 1/2 000. Il reste des agglutinines à un titre faible pour les souches-type ayant les antigènes O : 1,2,5, et 1,2,6, mais pas pour les souches ayant les antigènes H : 1,2,10 ; 1,2,36 ; 1,7,8 et 1,3,11. Ceci montre que 151-57 possède des antigènes 1 et 2 normalement développés, mais qu'il lui manque des fractions des antigènes 5 et 6. Les trois sérotypes connus qui possèdent les antigènes 1,2,5,6 n'ont pas d'antigènes H identique, chacun étant légèrement différent des autres. Les antigènes O de 151-57 sont étroitement liés à l'antigène O : 49 des *Salmonella* et les antigènes H aux antigènes H : z4,z23, de sorte que la souche peut être représentée par la formule antigénique de *Salmonella* 49 : z4,z23.

301-57 (19 : 22-31) est représenté par quatre cultures, isolées chez trois serpents différents. Aucun autre sérotype n'a été trouvé chez ces reptiles. Les cultures de 19 : 22-31, provenant de deux vipères capturées en Loire-Atlantique, font fermenter le saccharose et produisent de l'indole. Les deux cultures de la troisième vipère capturée en Vendée produisent aussi de l'indole, mais ne font pas fermenter le saccharose. Parmi les *Arizona* déjà décrits, seule une souche du sérotype 5 : 1,2,5 fait fermenter le saccharose, et une autre du sérotype 29 : 33-31 produit de l'indole.

La culture 301-57 est agglutinée au titre du sérum O : 19. Dans les épreuves d'absorption la culture laisse dans le sérum un léger reliquat d'agglutinines pour la souche homologue et pour les autres cultures du groupe O : 19. Les antigènes H sont diphasiques. La phase 1 est agglutinée au titre du sérum *Arizona* H : 22, et dans les épreuves d'absorption en sature toutes les agglutinines. De même, la phase 2

sature totalement les agglutinines du sérum H : 31. L'antigène O n'a pas de rapport à un titre significatif avec les antigènes O de *Salmonella*, mais l'antigène H : 22 de la phase 1, comme l'antigène H : 29 d'*Arizona*, est en rapport avec l'antigène H : k de *Salmonella*, quoique les antigènes H : 22 et 29 d'*Arizona* ne soient pas liés de façon significative l'un à l'autre. La phase 2 de 301-57 est en relation étroite avec l'antigène H : z de *Salmonella*.

115-57 (20 : 24-21) est représenté par trois cultures isolées d'un serpent et par une culture isolée d'un autre. Le premier reptile hébergeait aussi le sérotype 25 : 23-30, tandis que les sérotypes 12 : 27-28 et 25 : 23-30 étaient tous deux retrouvés chez le second. Les antigènes O sont identiques à ceux de la souche-test du groupe O : 20, comme l'ont démontré les épreuves d'agglutination et d'absorption. L'antigène H de la phase 1 est agglutiné au titre du sérum H : 24 *Arizona* et en sature toutes les agglutinines. L'antigène H de la phase 2 sature totalement le sérum H : 21 *Arizona*. Les antigènes O de 115-57 ne sont pas en rapport avec les antigènes O connus de *Salmonella*. L'antigène H de la phase 1 est en rapports étroits avec l'antigène H : r des *Salmonella*, tandis que l'antigène H de la phase 2 est en rapports étroits avec l'antigène H : z₃₅ de *Salmonella*.

RÉSUMÉ. — Cinq nouveaux sérotypes d'*Arizona* isolés des fèces de serpents apparemment normaux sont décrits. Ils sont représentés respectivement par les formules antigéniques 1,4 : 26-25 ; 9 : 29-31 ; 10 : 1,2,5,6 ; 19 : 22-31, et 20 : 24-21. Les détails de leur sérologie sont décrits et leurs relations sérologiques avec les *Salmonella* sont rapportées. Les quatre cultures du type 19 : 22-31 produisent de l'indole et deux souches font fermenter le saccharose. Chacune de ces propriétés biochimiques a été observée antérieurement une fois seulement dans les cultures du groupe *Arizona*.

SUMMARY

FIVE NEW *Arizona* SEROTYPES ISOLATED FROM REPTILES.

Five new *Arizona* serotypes isolated from the feces of apparently normal reptiles are described. They are represented respectively by the antigenic formulas 1,4 : 26-25 ; 9 : 29-31 ; 10 : 1,2,5,6 ; 19 : 22-31, and 20 : 24-21. The details of their serology are described and their serologic relationships with *Salmonellae* are given. All cultures of type 19 : 22-31 produced indol and two fermented sucrose as well. Each of these biochemical properties had been previously observed only once in cultures of the *Arizona* group.

★
★★

Nous remercions M^{lle} C. Charié-Marsaines pour sa collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

EDWARDS (P. R.), KAUFFMANN (F.) et FAIN (A.). *Acta path. microb. scand.*, 1953, **33**, 191.

UN NOUVEAU SÉROTYPE DE *SALMONELLA* : *SALMONELLA* MBAO (43:i — 1,2)

par L. et S. LE MINOR, P. KIRSCHÉ, R. BAYLET
et C. CHARIE-MARSAINES

(avec la collaboration technique de B. KHOURY).

(*Instituts Pasteur de Paris et de Dakar*)

Cette souche, mobile, a été isolée à Dakar par ensemencement de broyats de ganglions de deux porcs sur milieu SS après enrichissement sur Müller-Kauffmann. Elle possède une lysine-décarboxylase, n'a pas d'uréase, ni de tryptophane-désaminase, ne cultive pas sur milieu de Braun au CNK. Elle fait fermenter en vingt-quatre heures : xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbitol, dulcitol, tréhalose, glycérol (en milieu de Stern). L'adonitol, le sorbose, le lactose, le maltose, le saccharose, l'inositol, la salicine ne sont pas fermentés. Cette *Salmonella* cultive sur milieu de Simmons au citrate de sodium et fait fermenter le D-tartrate de sodium en milieu de Kauffmann. Elle ne produit pas d'indole, donne sur milieu de Clark et Lubs une réaction au rouge de méthyle positive et une réaction de Voges-Proskauer négative, réduit les nitrates en nitrites. Le dégagement de SH_2 est abondant. La gélatine n'est pas liquéfiée (méthode classique à 18° et méthode de Kohn modifiée par Lautrop à 37°). Cette souche est agglutinée sur lames par les sérums O:43, i et après passage sur gélose molle additionnée de sérum anti-i par 1,2 et 2 saturé.

La suspension O est agglutinée à 1/3 200 par le sérum anti-S. *milwaukee* O (titre homologue 1/6 400). La saturation de ce sérum par S. *mbao* enlève toutes les agglutinines.

La phase 1 (i) est agglutinée à 1/12 800 par un sérum anti-S. *typhi murium* phase 1 et en sature toutes les agglutinines. Il en est de même pour la phase 2 (1,2) vis-à-vis d'un sérum anti-S. *paratyphi* B phase 2.

RÉSUMÉ. — Description d'un nouveau sérotype de *Salmonella*, S. *mbao*, isolée de ganglions de porc à Dakar et de formule 43:i — 1,2.

SUMMARY

A NEW *Salmonella* TYPE : S. *mbao*.

Description of a new *Salmonella* type, S. *mbao*, isolated from swine ganglions at Dakar. Antigenic formula : 43:i — 1,2.

LA LYSINE-DÉCARBOXYLASE DES SÉROTYPES DES *E. COLI* DE GASTRO-ENTÉRITE DU NOURRISSON

par Léon LE MINOR, Simone LE MINOR et Pierre NICOLLE

(avec la collaboration technique de G. BRAULT et H. CHAUMONT).

(*Institut Pasteur*)

Moeller [1], puis Kauffmann et Moeller [2] ont montré l'intérêt que présentait dans le groupe des *Enterobacteriaceae* la recherche des décarboxylases de certains acides aminés : lysine, arginine, ornithine, acide glutamique. Moeller [3] proposa ultérieurement une simplification de sa méthode originelle, de même que Carlquist [4] pour la lysine-décarboxylase (LDC). La méthode de Carlquist est maintenant entrée dans la routine de nombreux laboratoires. Edwards, Fife et Ewing [5] d'une part, Thibault et l'un de nous [6] d'autre part, ont effectué la réaction sur de nombreuses souches et prouvé l'importance diagnostique de la recherche de cet enzyme. Nous avons montré au cours d'essais comparatifs que la méthode de Carlquist était utilisable sur des milieux solides d'usage courant comme le milieu dit lactose-glucose-SH₂, pourvu qu'ils soient préparés avec une peptone suffisamment dégradée (peptone tryptique de fibrine, par exemple). Tandis qu'avec les *Arizona* et les *Salmonella* la LDC est positive et qu'avec les *Escherichia freundii* elle est négative, dans le groupe *Escherichia coli* elle est soit positive, soit négative suivant les souches [6]. Ceci nous a amenés à rechercher systématiquement la LDC par la méthode de Carlquist parmi les sérotypes des *E. coli* de gastro-entérites et leurs lysotypes [7]. Nous rapportons ici nos observations portant sur 1 378 cultures. Pour environ 150 d'entre elles, la réaction a été effectuée plusieurs fois et à plusieurs mois d'intervalle. Les résultats ont toujours été identiques.

1° *Groupe sérologique* O111:B4. — a) O111:B4:H2. Nous avons examiné 245 souches de cette variété. Sur ce nombre, 231 souches appartenant aux lysotypes Montparnasse, Sèvres ubiquitaire, Sèvres variété lyonnaise et Tourcoing ont donné une réaction LDC positive. Quatorze souches des lysotypes Montparnasse et Sèvres ubiquitaire, isolées dans un même hôpital parisien à une même époque et parmi lesquelles il y avait 2 cultures d'un enfant et 3 cultures d'un autre enfant, ont donné une réaction LDC négative.

b) O111:B4:H4. Six souches du lysotype Israël : réaction LDC négative.

c) O111:B4:H12. Quatre-vingt-cinq souches des lysotypes Bretonneau, Dorf et Lille : réaction LDC positive.

d) O111 : B4 : H21. Vingt et une souches du lysotype Palerme : réaction LDC négative.

e) O111 : B4 : H40. Quatre souches du lysotype Nagoya : réaction LDC négative.

f) O111 : B4 : H—. Sept souches du lysotype Clichy, réaction LDC positive. Une autre souche non lysotypable : réaction LDC négative.

g) *E. freundii* O111 : B4. Deux souches : réaction LDC négative.

TABLEAU I.

Groupe sérologique	Antigène flagellaire	Nombre de cultures examinées	Lysotypes	Réaction à l'acide β -phényl-propionique	Réaction LDC
O111:B4	H2	231	Montparnasse, Sèvres, Sèvres var. lyonnaise, Tourcoing	+	+
		14	Montparnasse, Sèvres	+	-
	H4	6	Iraël	-	-
	H12	85	Bretonneau, Dorf, Lille	-	+
	H21	21	Palerme	-	-
	H40	4	Nagoya	-	-
	H—	7	Clichy	-	+
		1	non lysotypable	-	-
<i>E. freundii</i> O111:B4		2	non lysotypable	-	-

2° Groupe sérologique O55 : B5. — a) O55 : B5 : H2. Quatre souches donnant une réaction négative avec l'acide β -phénylpropionique (réaction de d'Alessandro et Comes [8]), et appartenant aux lysotypes Lomme, Londres et Flandre : réaction LDC positive.

Cinquante et une souches donnant une réaction positive avec l'acide β -phénylpropionique et appartenant au lysotype St. Christopher : réaction LDC positive.

b) O55 : B5 : H4. Quatre souches du lysotype Finlande : réaction LDC positive.

c) O55 : B5 : H6. Cent huit souches des lysotypes Flandre, Graz, Londres, Rostock, Lomme et Béthune : réaction LDC positive.

d) O55 : B5 : H7. Quarante-deux souches des lysotypes Weiler et Londres : réaction LDC positive.

e) O55 : B5 : H11. Deux souches du lysotype Flandre : réaction LDC positive.

f) O55 : B5 : H21. Trois souches du lysotype Béthune : réaction LDC positive.

g) O55 : B5 : H27. Deux souches du lysotype Flandre : réaction LDC positive.

h) O55 : B5 : H32. Treize souches du lysotype Jérusalem : réaction LDC positive.

i) O55 : B5 : H —. Une souche non lysotypable : réaction LDC positive.

En outre, 474 autres souches du groupe O55 : B5 dont l'antigène flagellaire n'a pas été identifié ont donné une réaction LDC positive.

TABLEAU II.

Groupe sérologique	Antigène flagellaire	Nombre de cultures examinées	Lysotypes	Réaction à l'acide D-phényl-pro-pionique	Réaction LDC
O55 : B5	H2	51	St.Christopher	+	+
		4	Lomme, Londres, Flandre	-	+
	H4	4	Finlande	-	+
	H6	108	Flandre, Graz, Londres, Rostock, Lomme, Béthune	-	+
	H7	42	Weiler, Londres	-	+
	H11	2	Flandre	-	+
	H21	3	Béthune	-	+
	H27	2	Flandre	-	+
	H32	13	Jérusalem	-	+
	H-	1	non lysotypable	-	+
	n.r.(*)	474	divers	-	+

(*) n. r., non recherché.

3° Groupe sérologique O26 : B6. — a) O26 : B6 : H4. Une souche non lysotypable : réaction LDC positive.

b) O26 : B6 : H11. Vingt-cinq souches du lysotype Birmingham : réaction LDC positive.

c) O26 : B6 : H21. Deux souches du lysotype Liège : réaction LDC positive.

d) O26 : B6 : H32. Quatre souches du lysotype Berlin : réaction LDC positive.

e) O26 : B6 : H —. Vingt et une souches des lysotypes Warwick et Liège : réaction LDC positive.

En outre, 63 autres souches du groupe O26 : B6 prises au hasard dans notre collection et dont l'antigène flagellaire n'avait pas été identifié ont donné une réaction LDC positive.

4° Groupe sérologique O86 : B7. — Cinquante-huit souches : réaction LDC positive.

5° Groupe sérologique O119 : B14. — Cent sept souches : réaction LDC positive.

6° Groupe sérologique O125 : B15. — Deux souches : réaction LDC positive.

7° Groupe sérologique O126 : B16. — Une souche : réaction LDC positive.

TABLEAU III.

Groupe sérologique	Antigène flagellaire	Nombre de cultures examinées	Lysotypes	Réaction à l'acide β -phényl-propionique	Réaction LDC
O26:B6	H4	1	non lysotypable	-	+
	H11	25	Birmingham	-	+
	H21	2	Liège	-	+
	H32	4	Berlin	-	+
	H-	21	Warwick, Liège	-	+
	n.r. (*)	63	divers	-	+
O86:B7		58		-	+
O119:B14		107		-	+

(*) n. r., non recherché.

8° Groupe sérologique O127 : B8. — Quatorze souches : réaction LDC positive. Ces cultures provenaient de France, de Grande-Bretagne et du Mexique. La souche-type de Copenhague, au contraire, ne donne pas la réaction LDC.

9° Groupe sérologique O128 : B12. — Quatre souches : réaction LDC positive.

CONCLUSIONS. — La recherche de la lysine-décarboxylase par la méthode de Carlquist s'est montrée constamment positive pour les groupes sérologiques O55 : B5 (704 souches), O26 : B6 (116 souches), O86 : B7 (58 souches) et O119 : B14 (107 souches), quels que soient les antigènes flagellaires en présence.

Le groupe sérologique O111 : B4 ne se comporte pas d'une manière homogène à l'égard de la réaction LDC. Toutes les souches possédant l'antigène H12 (85 souches) ont donné une réaction positive. Au contraire, les souches possédant les antigènes H4 (6 souches), H21 (21 souches), H40 (4 souches) ont été négatives. Il en a été de même pour les *E. freundii* O111 : B4, ce qui est la règle pour ces Entérobactéries [5, 6].

Enfin, si la grande majorité des souches O111 : B4 possédant l'antigène H2 (231 souches) ont donné une réaction LDC positive, quelques-unes (14 souches), provenant d'un foyer hospitalier distinct, ont été négatives.

Le comportement variable des souches du groupe O111 : B4 confère à la réaction LDC un intérêt épidémiologique qui ne se confond pas avec celui des autres réactions habituellement utilisées.

Nous avons vu en effet qu'elle n'est pas liée à la réaction à l'acide β -phénylpropionique puisque, si elles sont toutes les deux négatives pour les O111 : B4 : H4, les O111 : B4 : H40, les O111 : B4 : H21 et les *E. freundii*, et toutes les deux positives avec la grande majorité des

O111 : B4 : H2 et O111 : B4 : H —, la première est positive et la seconde négative avec les O111 : B4 : H12, tandis qu'on constate l'inverse avec quelques souches des O111 : B4 : H2.

Elle ne suit pas non plus toujours fidèlement les réactions lysotypiques puisque certaines souches des lysotypes Sèvres et Montparnasse, qui sont en grande majorité positifs, peuvent ne pas donner la réaction.

Il en est de même pour le groupe sérologique O55 : B5 dans lequel certaines souches de la variété O55 : B5 : H2 donnent la réaction LDC et la réaction à l'acide β -phénylpropionique (chimiotype D, lysotype St. Christopher) [9], tandis que d'autres souches (chimiotypes et lysotypes variés) donnent une réaction LDC positive et une réaction à l'acide β -phénylpropionique négative.

Le nombre restreint des souches des autres sérotypes de gastro-entérite infantile que nous avons eu l'occasion d'étudier permet seulement de dire que la réaction LDC y semble en général positive.

RÉSUMÉ. — La présence d'une lysine-décarboxylase a été recherchée par la méthode de Carlquist parmi 1 378 souches d'*E. coli* de gastro-entérite de divers sérotypes. Constamment positive avec les sérotypes O55 : B5, O26 : B6, O86 : B7, O119 : B14, elle est variable dans le groupe 111 : B4. Sa recherche parmi les souches de ce groupe présente certainement un intérêt épidémiologique.

SUMMARY

LYSIN-DECARBOXYLASE OF *E. coli* SEROTYPES ISOLATED FROM INFANTILE GASTRO-ENTERITIS.

1 378 strains of different serotypes of *E. coli* isolated from infantile gastro-enteritis have been examined by means of Carlquist's method for the presence of a lysin-decarboxylase. The results have always been positive with O55 : B5, O26 : B6, O86 : B7 and O119 : B14, variable with the O111 : B4 group. The demonstration of a lysine-decarboxylase in the strains of this group would be interesting from an epidemiological point of view.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MOELLER (V.). *Acta path. microb. scand.*, 1954, **35**, 259.
- [2] KAUFFMANN (F.) et MOELLER (V.). *Acta path. microb. scand.*, 1955, **36**, 173.
- [3] MOELLER (V.). *Acta path. microb. scand.*, 1955, **36**, 158.
- [4] CARLQUIST (P. R.). *J. Bact.*, 1956, **71**, 339.
- [5] EDWARDS (P. R.), FIFE (M. A.) et EWING (W. H.). *Am. J. med. Technol.*, 1956, **22**, 28.
- [6] THIBAUT (P.) et LE MINOR (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 551.
- [7] NICOLLE (P.), LE MINOR (L.), BUTTIAUX (R.) et DUCREST (P.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1952, **136**, 480 et 483. — NICOLLE (P.), LE MINOR (L.), LE MINOR (S.) et BUTTIAUX (R.). *Zbl. Bakt.*, I., 1957, **168**, 512.
- [8] ALESSANDRO (G. D') et COMES (R.). *Boll. I. S. M.*, 1952, **31**, 291.
- [9] LE MINOR (S.), LE MINOR (L.), NICOLLE (P.) et BUTTIAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 204.

DONNÉES APPORTÉES PAR L'UTILISATION DES MILIEUX SYNTHÉTIQUES SUR LA TRANSFORMATION L DU *PROTEUS* P 18

par R. MINCK, A. KIRN et M^{me} GALLERON.

(Institut d'Hygiène et de Bactériologie,
Faculté de Médecine de Strasbourg)

Dienes a décrit, en 1949, deux variétés de colonies L : le type 3 A et le type 3 B, que l'on peut différencier par la taille des colonies, l'importance de l'auréole périphérique et surtout par la propriété des colonies 3 B de cultiver sur des milieux ne contenant pas de sérum et de réverser rapidement en l'absence de pénicilline, en redonnant naissance à la bactérie d'origine. Cette double possibilité de la transformation L des bactéries ne semble pas avoir retenu outre mesure l'attention, vraisemblablement parce que, suivant les conditions de transformation L réalisées, l'un ou l'autre type prédomine, souvent même un des types seul apparaît.

Kandler et Kandler ont étudié cette question dans un intéressant travail paru en 1956. Utilisant la souche « 52 » de *Proteus* Dienes, ils déclarent avoir réussi à isoler les deux types de colonies L qui seraient stables et posséderaient des propriétés différentes.

Depuis les travaux de Medill et O'Kane, on sait obtenir la transformation L du *Proteus* sur des milieux synthétiques. Di Gregorio et Bresciani ont repris cette étude. Nous-mêmes avons exposé récemment les résultats obtenus avec divers milieux synthétiques.

Pour le présent travail, nous avons utilisé la souche *Proteus* P 18 et un milieu synthétique gélosé contenant des sels minéraux, du sulfate d'ammonium et du lactate de sodium, décrit dans une publication précédente.

Sur ce milieu additionné de pénicilline (1 000 unités/ml) les colonies L du type 3 B apparaissent quarante-huit heures après l'ensemencement avec une culture de *Proteus*. Au cours des repiquages, les colonies sont déjà visibles après vingt-quatre heures. Macroscopiquement, d'un diamètre de l'ordre du millimètre, elles sont toutes constituées par un centre dense incrusté dans la gélose, entouré d'une auréole très développée. Au microscope à contraste de phase, on constate que l'auréole et le centre des colonies jeunes sont formés d'éléments globuleux arrondis, de taille assez uniforme, totalement opaques ou présentant des opacités en croissant.

On observe parfois, à la périphérie des colonies, des granulations de petite taille animées de mouvements rapides ; ces éléments, que l'on ne voit jamais évoluer en corps globuleux, ne sont vraisemblablement pas viables. Dans les colonies plus âgées, on ne distingue plus que

quelques corps globuleux intacts et des corps globuleux clairs, paraissant vidés de leur substance, noyés dans une masse d'organismes en voie de lyse.

L'aspect microscopique de ces cultures n'est donc pas identique à celui des cultures obtenues sur le milieu classique : gélose nutritive-sérum-pénicilline.

Ces colonies sont repiquables indéfiniment sur milieu synthétique pénicilliné, à condition d'effectuer les repiquages régulièrement tous les huit à dix jours. En l'absence d'antibiotique, même après un très grand nombre de passages, la réversion en *Proteus* normal se produit.

Nous avons repiqué, par la technique des décalques, des cultures qui avaient subi au préalable 9, 20, 35 et 61 passages sur milieu synthétique pénicilliné, sur un même milieu, mais enrichi de 20 p. 100 de sérum de cheval. Très rapidement, quel que soit le nombre des repiquages antérieurs sur le milieu synthétique, on observe des modifications microscopiques et macroscopiques des cultures : après vingt-quatre heures d'incubation, quelques colonies fortement auréolées, du type 3 B, sont déjà visibles. Mais trois ou quatre jours plus tard, apparaissent des colonies beaucoup plus petites, profondément incrustées dans la gélose, avec une auréole de très petite taille, parfois même imperceptible ; elles sont souvent disposées en couronne sur l'empreinte de la zone périphérique d'une ancienne colonie ; l'aspect macroscopique de ces colonies correspond au type 3 A. Au cours des repiquages ultérieurs sur milieu synthétique enrichi de sérum, la proportion des colonies du type 3 B diminue et à la longue le type 3 A subsistera seul. Parallèlement, on observe des modifications importantes de la morphologie microscopique : les corps globuleux caractéristiques des cultures 3 B se lysent, puis, par endroits, on distingue des ébauches de colonies sans corps globuleux encore visibles, qui à ce stade présentent de grandes analogies avec les colonies de PPLO. Ce n'est que plus tard qu'apparaissent des corps globuleux de taille très variable, parfois bourrés de granulations mobiles, surtout nombreux à la périphérie de la colonie : les cultures présentent alors la morphologie classique et souvent décrite de ce que nous avons, avec Tulasne, précédemment proposé d'appeler le cycle L complet.

En dehors de ces modifications morphologiques, la variante 3 A, apparue en présence de sérum de cheval, a perdu la propriété de

LEGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Premier repiquage de culture L type 3 B sur milieu synthétique enrichi en sérum. Nombreuses colonies 3 A, quelques colonies 3 B plus grandes et fortement auréolées.

FIG. 2. — Partie supérieure : neutralisation de la culture L fixée en présence d'antisérum homologue qui imbibé la bande de papier. Partie inférieure : aucune action du même sérum sur une culture L non fixée type 3 B.

FIG. 3. — Neutralisation de la culture L fixée en présence d'antisérum homologue. A droite, pastille imbibée de 1/10 de millilitre de sérum dilué au 1/5 ; à gauche, pastille imbibée de 1/10 de millilitre de sérum dilué à 1/10.

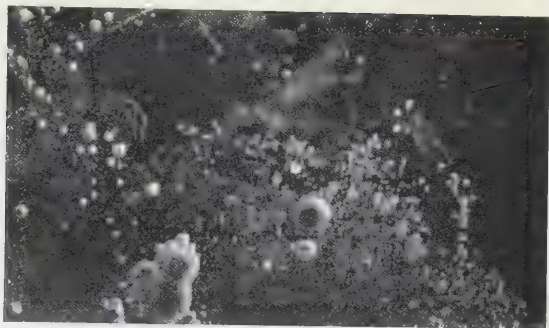


FIG. 1.



FIG. 2

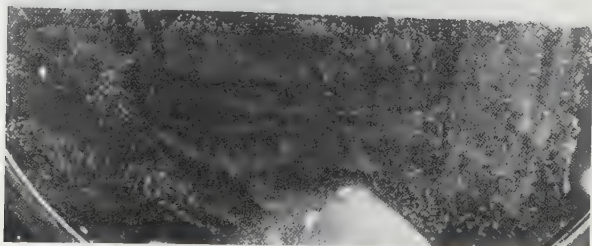


FIG. 3.



réverser, c'est-à-dire de redonner naissance à la bactérie d'origine en l'absence de pénicilline. Une fois, dès le premier passage sur milieu enrichi de sérum, mais le plus souvent au troisième, quatrième passage, la fixation était réalisée. Ce phénomène doit, en réalité, toujours se produire dès le premier passage ; les réversions observées sont vraisemblablement dues à des éléments de colonies 3 B difficiles à éliminer.

Ces observations ne nous permettent donc pas d'adopter les vues des Kandler sur la stabilité du type 3 B. Le type 3 B n'est pas un type stable et définitif, il ne constitue qu'une étape de la transformation L. Grâce à l'emploi des milieux synthétiques, on peut mettre en évidence deux phénomènes distincts : le premier aboutissant à la formation de cultures du type 3 B sur milieu synthétique ; le deuxième qui permet d'obtenir, à partir d'une culture du type 3 B, et uniquement sur milieu enrichi de sérum, la forme 3 A, « fixée », définitive.

Que représentent ces deux types de cultures dans le phénomène de la transformation L ?

Comme les Kandler l'ont montré, de multiples facteurs peuvent favoriser l'apparition de l'un ou l'autre type. Si le type 3 B, non sérophile, est moins exigeant, il semble par contre plus sensible à des facteurs toxiques contenus dans le sérum. Certains auteurs, d'autre part, pensent que le type 3 A est sensible à des substances toxiques contenues dans les peptones ou les extraits de viande ; la présence de sérum serait indispensable pour neutraliser ces substances. Récemment, Lorkiewicz dit avoir obtenu des cultures L de *Proteus* du type 3 A, en l'absence de sérum, sur milieu additionné de charbon de bois. Rappelons que nous n'avons utilisé que des milieux synthétiques gélosés, et cette hypothèse ne peut être soutenue dans les expériences présentes.

Les modifications de certains caractères biologiques comme la perte de la faculté de réverser, qui accompagnent le passage du type 3 B au type 3 A, ne font vraisemblablement que témoigner d'importants changements survenus dans le mode de reproduction de ces organismes. Il était intéressant de rechercher d'autres modifications dans le comportement biologique de ces deux types. Nous en signalerons plus particulièrement une. Edward a montré l'action neutralisante spécifique des anti-sérums sur les cultures de PPLO. Il a pu reproduire le même phénomène avec une souche L d'origine bactérienne. Nous avons repris cette étude en recherchant comparativement l'effet de l'anti-sérum microbien sur les cultures 3 A et 3 B. Les cultures du type 3 A sont très nettement inhibées par l'anti-sérum spécifique, alors que, par contre, la multiplication des organismes du type 3 B ou celle de la bactérie normale n'est nullement entravée. Nous exposerons avec plus de détails ces expériences dans une publication ultérieure.

RÉSUMÉ. — Les cultures du type 3 B obtenues sur milieu synthétique gélosé peuvent donner naissance à des cultures du type 3 A en présence de sérum. Les modifications des caractères biologiques qui accompagnent le passage du type 3 B au type 3 A, en particulier la perte de l'aptitude à réverser et la sensibilité à l'effet neutralisant des anti-sérums, témoignent vraisemblablement de différences dans le mode de reproduction de ces organismes.

SUMMARY

USE OF SYNTHETIC MEDIA IN THE STUDY OF THE L-TRANSFORMATION
OF *Proteus* P 18.

3B type cultures, obtained on synthetic agar medium can give 3A type cultures in the presence of serum. The modifications of biological properties which are induced by the passage of 3B type to 3A type, particularly the loss of ability to reverse and the sensitivity to the neutralizing effect of immune sera, seem to evidence differences in the reproduction mechanism of these microorganisms.

BIBLIOGRAPHIE

- DIENES (L.). *J. Bact.*, 1949, **57**, 529.
 DIENES (L.) et WEINBERGER (H. J.). *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 241.
 DI GREGORIO (P.) et BRESCIANI (F.). *Giorn. Microbiol.*, 1956, **4**, 278.
 EDWARD (D. J.) et FITZGERALD (W. A.). *J. Path. Bact.*, 1954, **68**, 23.
 KANDLER (O.) et KANDLER (G.). *Z. Naturforsch.*, 1956, **11**, 252.
 LORKIEWICZ (Z.). *Acta Microb. Polon.*, 1957, **6**, 3.
 MEDILL (M. A.) et O'KANE (N. J.). *J. Bact.*, 1954, **68**, 530.
 MINCK (R.), KIRN (A.) et M^{me} GALLERON (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 138.
 TULASNE (R.), MINCK (R.) et LAVILLAUREIX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 525.

ÉTUDE DE L'ACTION CYTOPATHOGÈNE DE L'ADÉNOVIRUS TYPE 7, EN CULTURES CELLULAIRES

par M^{lle} Jeanné ORFILA.

(Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine d'Alger)

L'emploi de la technique des cultures de cellules humaines a permis à Rowe et Huebner en 1953 [4], puis à de nombreux chercheurs, d'isoler les virus provoquant la dégénérescence des cultures de cellules épithéliales *in vitro*. Ces virus, d'abord groupés sous l'étiquette « adéno-pharyngo-conjonctival », ou A. P. C., sont maintenant nommés adéno-virus selon la terminologie proposée par Enders. Ils déterminent tous dans les cultures des altérations caractéristiques suivies de destruction cellulaire.

Les conditions très diverses dans lesquelles ils ont été trouvés et la pluralité des manifestations qu'ils provoquent ont fait poser la question de l'existence de types différents. Une première réponse fut fournie par l'étude sérologique qui a montré qu'à côté de l'antigène

commun à toutes les souches existent des antigènes permettant de différencier des types ; on en a décrit 14. L'étude microscopique des cultures cellulaires peut apporter des renseignements supplémentaires. Barski a décrit l'inégale rapidité des altérations produites *in vitro* par les types 1, 3, 4, 5 [2], et Ginsberg a insisté sur les différences essentielles caractérisant les lésions déterminées en cellules HeLa par les types 1, 2, 3, 4 et sur la possibilité de distinguer ainsi à l'intérieur du groupe des adénovirus des familles bien individualisées par leur pouvoir cytopathogène [3]. C'est pourquoi nous nous sommes attachée à l'étude du type 7 qui n'avait pas encore été entreprise. Ces recherches ont été réalisées au Laboratoire de Bactériologie d'Amsterdam grâce au matériel mis à notre disposition et aux conseils qui nous ont été donnés par le Dr Dekking.

Depuis la terminaison de ce travail, nous avons eu connaissance de la communication de Pruniéras, Chardonnet et Sohier. Ces auteurs ont aussi cultivé les adénovirus 7 et 7a sur cellules HeLa, et ont observé une augmentation considérable des acides ribonucléiques, cytoplasmiques et nucléaires [5].

MATÉRIEL UTILISÉ ET TECHNIQUE.

Les adénovirus se développent bien en cellules de rein de singe, en cellules HeLa et en cellules de rein humain. Nous avons choisi ce dernier matériel qui présente peu ou pas de monstruosité cellulaires. La souche de cellules est entretenue par passages successifs après trypsination et mise en suspension dans la solution de Hanks renfermant 0,5 p. 100 de lactalbumine et 5 p. 100 de sérum de veau. Ayant adopté le modèle de tube aplati à lamelle amovible décrite par Barski [4], nous déposons la suspension cellulaire sur la lamelle déjà en place au fond du tube. La croissance se fait très régulièrement. Onze tubes servent de témoins, onze autres tubes sont inoculés avec 0,1 cm³ d'une suspension virale d'adénovirus type 7 de titre 10⁻⁶. Les tubes sont examinés à un faible grossissement ($\times 20$) à travers l'épaisseur de la paroi du tube et de la lamelle, à des temps que nous avons fixés arbitrairement à douze, dix-sept, vingt et une, trente-six, quarante, quarante-huit, cinquante-quatre, soixante, soixante-six, soixante-douze et quatre-vingt-quatre heures. Chaque fois une lamelle d'un tube témoin et une lamelle d'un tube inoculé sont prélevées et colorées. Pour ce faire, on retire le liquide nutritif, on lave légèrement avec la solution de Hanks, puis on fixe au Zenker pendant vingt minutes ; la fixation est suivie de trois lavages à l'alcool ; les lamelles sont alors retirées du tube à l'aide d'un fil coudé, colorées à l'hématoxyline-éosine et examinées au grossissement 300.

RÉSULTATS.

I. Altérations macroscopiques. Elles apparaissent quarante-huit heures après l'inoculation. Les premières lésions sont localisées à la périphérie de la couche cellulaire. Les cellules épithéliales ont pris une forme arrondie et sont très réfringentes. Elles augmentent de volume ; leurs contours restent réguliers et nets. Puis plusieurs cellules forment

des amas à bord moins bien délimité, rappelant un phénomène d'agglutination. Cet aspect nous a paru avoir une valeur certaine pour différencier macroscopiquement les lésions provoquées par les adénovirus de celles produites par le virus herpétique. Deux à trois jours après l'inoculation, des destructions cellulaires entraînent la formation de plages vides et l'ensemble de la culture présente un aspect de réseau à mailles constituées par des cellules altérées. A la quatre-vingt-quatrième heure toutes les cellules sont atteintes et beaucoup se sont détachées de la paroi du tube. Notons que ce type d'altération déjà signalé [2], s'il semble caractériser les adénovirus, ne permet pas de différencier les types : les tubes inoculés avec les types 1, 2, 3, 4, 6 ont présenté le même aspect à l'examen macroscopique ; la rapidité de la destruction cellulaire est cependant plus importante pour les types 4 et 6.

II. *Altérations microscopiques.* Les premières lésions sont notées dix-sept heures après l'inoculation. Elles sont peu nombreuses, discrètes et portent exclusivement sur le noyau. Ce dernier apparaît comme vidé de toute substance, clair au milieu d'un cytoplasme normalement coloré ; seuls les nucléoles restent intacts. Le prélèvement fait vingt-quatre heures après l'inoculation nous renseigne sur l'évolution des lésions dans les cellules déjà touchées et sur l'extension aux cellules environnantes. Dans les noyaux clairs se différencient des zones denses homogènes basophiles ; les nucléoles persistent, sont plus intensément colorés et sont séparés de ces blocs basophiles par de petites zones claires. Ultérieurement, l'ensemble du noyau est occupé par une substance basophile homogène au sein de laquelle les nucléoles restent toujours visibles. Puis la masse centrale intranucléaire devient de plus en plus dense et s'entoure d'une zone périphérique plus claire qui la sépare de la membrane ; cette zone claire est traversée par de petites brides irrégulières ; à ce stade les nucléoles ne sont plus visibles. Le cytoplasme ne présente ni vacuoles ni inclusions.

Dès la vingt-quatrième heure, sur le pourtour des cellules altérées, apparaissent des cellules multinucléées, à cinq noyaux en moyenne. Souvent un de ces noyaux est déjà altéré. Cette lésion n'est apparue qu'avec le type 7 et semble être spécifique. Rappelons que les lésions herpétiques en sont très proches, mais en diffèrent surtout par la présence d'inclusions qui manquent dans les cultures d'adénovirus.

Les différents stades de la dégénérescence sont visibles sur la même culture de tissus dès la quarante-huitième heure. Les cellules altérées sont groupées en rosaces, les lésions les plus jeunes étant à la périphérie. Ce fait met en évidence le mode d'invasion par contiguïté d'une cellule à une autre. Quelques essais, qui devront être répétés, nous ont montré que pendant les deux premiers jours la teneur en virus du liquide surnageant n'augmente pas, le virus restant intracellulaire.

CONCLUSION.

Les lésions des cellules en culture de rein humain déterminées par l'adénovirus type 7 se distinguent des lésions dues aux types 1 et 2 par l'absence d'altérations cytoplasmiques et de modifications éosino-

philes nucléaires. Par contre elles ressemblent beaucoup, par le caractère des altérations du noyau, à celles produites par les types 3 et 4, telles que Ginsberg les a décrites ; seule la présence de plasmodies multinucléés leur confère une particularité. Il faudra cependant étudier un plus grand nombre de types pour savoir s'il est légitime de distinguer des familles bien différenciées dans le groupe des adénovirus.

SUMMARY

STUDY OF THE CYTOPATHOGENIC ACTIVITY OF ADENOVIRUS TYPE 7
IN TISSUE CULTURES.

Adenovirus type 7 has been cultivated in human kidney tissue cultures. The cellular lesions produced differ from those due to types 1 and 2 by the absence of cytoplasmic alterations and of nuclear eosinophilic modifications. On the other hand, the pattern of nuclear lesions is very similar to that of types 3 and 4 ; their only characteristic is the presence of multinuclear plasmodies. It is however necessary to study a greater number of types, in order to know whether it is legitimate to distinguish very different families in the adenoviruses group.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ROWE (W. P.), HUEBNER (R. J.), GILMORE (L. K.), PARROT (R. H.) et WARD (T. G.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **84**, 570.
- [2] BARSKI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **90**, 614.
- [3] GINSBERG (H.). *Ann. New York Acad. Sci.*, 1957, **67**, 383.
- [4] BARSKI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **90**, 512.
- [5] PRUNIERAS (M.), CHARDONNET (Y.) et SOHIER (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 798.

Les communications suivantes paraîtront en Mémoire dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Variations expérimentales du taux des anti-enzymes streptococciques chez le cobaye, par J. VIALIER, A. BERTOYE, M. CARRAZ, A.-L. COURTIEU, J. VIAL et F. GUILLERMET.

Les streptocoques fécaux dans les eaux d'alimentation. Recherche. Espèces rencontrées. Signification, par R. BUTIAUX.

Effets physiologiques de levanes produites par *Bacillus subtilis*, par Y. JOYEUX, A. EYQUEM et R. DEDONDER.

Elaboration par *Lactobacillus acidophilus* d'un produit actif sur *Candida albicans*, par N. GUILLOT.

LIVRES REÇUS

Ciba Foundation Symposium on drug resistance in micro-organisms.
1 vol., 352 p., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1957. Prix :
50 shillings.

Un grand nombre de communications ont été présentées à ce Symposium et les différents points de vue, physiologique, biochimique et génétique de la question envisagés. Sans que l'on puisse dire que le problème du mécanisme de la résistance a été résolu, il semble que des positions moins absolues sur cette question soient maintenant adoptées par plusieurs auteurs.

H. T.

M. Chèvremont. — *Notions de Cytologie et Histologie.* 1 vol., 994 p., Editions Desoer, Liège.

Remarquable manuel, on pourrait dire même *Traité d'histologie médicale et comparée*, indispensable aux biologistes et aux médecins. Il comporte un grand nombre d'illustrations, de tableaux et de références bibliographiques.

L'auteur y attribue un développement considérable du fait des progrès continuels de la culture des tissus, de la microscopie en contraste de phase et de la microcinématographie, de la cytochimie qualitative et quantitative, de la microscopie électronique, etc., à ces différentes techniques. En ce qui concerne les tissus et organes, il s'est efforcé de joindre à une description de la morphologie microscopique et sub-microscopique, faite sans entrer dans trop de détails, l'étude de la composition chimique et de la signification fonctionnelle.

Ce sont surtout les Vertébrés supérieurs qui sont étudiés ici. La matière de la Cytologie et de l'Histologie modernes est tellement vaste qu'il lui a fallu se limiter. Il est impossible d'être complet et d'exposer tous les travaux intéressants ; de nombreuses acquisitions récentes ont cependant été citées. Si, dans plusieurs domaines, la matière de ces sciences n'a pas beaucoup changé, l'évolution des recherches en de nombreux autres et le progrès continu des techniques sont tels que, fréquemment, un chapitre à peine clos risque de devenir incomplet. Il lui a paru pourtant utile d'essayer de faire le point. Malgré leur intérêt, de nombreuses acquisitions de l'Embryologie moderne n'ont pas été exposées de manière systématique ; plusieurs ont toutefois été citées occasionnellement.

J. L.

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 94

Notices nécrologiques.

† F. COUTELEN (1897-1957)	654
† C. FROMAGEOT (1899-1958)	500
† E. GRASSET (1893-1957)	224
† A. URBAIN (1884-1957)	367

ALFÖLDI (L.). — La production induite de mégacine en milieu synthétique.	474
ATANASIU (P.). — Voir PEARSON (H. E.).	
AUDRAN (R.). — Détermination du taux de complément dans différentes espèces animales	541
— Etude du taux du complément humain en fonction du titre des agglutinines anti-A et anti-B	515
AUDRIN (J.). — Culture des bacilles tuberculeux sur papier filtre.	238
AUGIER (J.) et LAVERGNE (D.). — Numération de la microflore totale et microstructure des sols. II. Conséquences pratiques . .	766
— et POCHON (J.). — La numération des germes telluriques par la microscopie directe en lumière blanche et en fluorescence.	615
BALTAZARD (M.), BOUÉ (A.) et SIADAT (H.). — Etude du comportement du virus de la variole en cultures de tissus . . .	560
BARJAC (H. DE). — Voir POCHON (J.).	
BARME (M.). — Le sérum antirabique dans le traitement des morsures de la face au Nord-Vietnam	384
BARSKI (G.) et CORNEFERT (F.). — Aspects distinctifs des lésions cellulaires causées <i>in vitro</i> par différents types d'adénovirus	724
BAYLET (L.). — Voir LE MINOR (L.).	
BAZIN (S.) et DELAUNAY (A.). — Etudes sur le collagène. XII. Action de divers polyosides (y compris des polyosides bactériens) sur du collagène natif (collagène de tendon) . .	7
BINGENHEIMER (J.). — Voir WILLISTON (E. H.).	
BIOZZI (G.), STIFFEL (C.), HALPERN (B. N.) et MOUTON (D.). — Etude de la fonction phagocytaire du S. R. E. au cours du développement de tumeurs malignes expérimentales chez le rat et la souris	681

- BIRZU (N.). — Voir CONSTANTINESCO (N.).
- BOQUET (P.). — Voir IZARD (Y.).
- BOYER (F.). — Voir CHEDID (L.).
- BRÈS (P.). — Voir DARRASSE (H.).
- BRISOU (J.). — Les *Achromobacter* nitrates-réducteurs sans action sur les glucides et les protéines 369
- TYSSET (C.) et VACHER (B.). — Etude sur *Achromobacter desmolyticus* isolé d'un élevage de grenouilles 775
- Voir MÉNANTAUD (J.).
- BUTTIAUX (R.). — Les streptocoques fécaux des intestins humains et animaux 778
- Voir WILSSENS (A.).
- CAMAIN (R.). — Voir DARRASSE (H.).
- CAYRÉ (R. M.). Voir VIALIER (J.).
- CHABBERT (Y.). — Voir PATTE (J. C.).
- CHAIGNEAU (M.). — Voir FAUCONNIER (B.).
- CHAMBON (L.). — Voir FIFE (M. A.).
- Voir EDWARDS (P. R.).
- CHAMFEUIL (R.). — Voir MOLLARET (L.).
- CHARIÉ-MARSAINES (C.). — Voir LE MINOR (L.).
- CHEDID (L.) et BOYER (F.). — Le sérum anticoquelucheux s'oppose à la sensibilisation consécutive à la vaccination de la souris par *H. pertussis* 341
- COHEN (G. N.). — Synthèse de protéines « anormales » chez *E. coli* K12 cultivé en présence de L-valine 15
- COLOBERT (L.) et LOUISOT (P.). — Uniformité des altérations morphologiques chez les bactéries soumises à des agressions de types différents. Structure granulaire du cytoplasme bactérien 463
- et MORÉLIS (P.). — Nouveau milieu sélectif pour l'isolement des Entérocoques, d'emploi pratique pour leur recherche et leur numération dans l'eau 120
- CONSTANTINESCO (N.) et BIRZU (N.). — Phénomène d'autostérilisation et guérison dans la rage expérimentale 739
- CORNEFERT (F.). — Voir BARSKI (G.).
- CRISTESCU (P.). — Voir STAMATIN (N.).
- CROISSANT (O.), LÉPINE (P.) et WYCKOFF (R. W. G.). — Sur le développement du virus vaccinal 294
- DARRASSE (H.), BRÈS (P.) et CAMAIN (R.). — Note sur le diagnostic de la variole au laboratoire 577
- DELAUNAY (A.). — Voir BAZIN (S.).
- DESCHIENS (R.). — Les distomatoses hépatiques humaines en France 256
- DREVON (A.). — Voir MONNET (P.).
- DUNOYER (F.). — Voir GASTINEL (P.).

- DURIEUX (J.). — Voir LAPRESLE (C.).
- EDWARDS (P. R.), FIFE (M. A.), LE MINOR (L.) et CHAMBON (L.). —
Cinq nouveaux types d'*Arizona* isolés de reptiles . . . 782
— Voir FIFE (M. A.).
- EYQUEM (A.). — Voir PODLIACHOUK (L.).
- FABIANI (M. G.) et ORFILA (J.). — Résistance naturelle du lapin
à l'infection expérimentale par *P. berghei*. Analyse des
facteurs immunologiques . . . 428
- FAGUET (M.). — Voir MATHIEU (N.).
- FAUCONNIER (B.). — Développement du virus grippal et pH du
liquide allantoïque de l'œuf embryonné. VII. Diagnostic
de l'infection virale du liquide par une méthode colori-
métrique . . . 512
— et CHAIGNEAU (M.). — Inhibition de la multiplication du
virus grippal par la thioparatoluidine et certains de ses
dérivés . . . 514
- FAYET (M. T.) et PONCET (G.). — Immunoélectrophorèse appliquée
au virus aphteux . . . 732
- FIFE (M. A.), LE MINOR (L.), EDWARDS (P. R.) et CHAMBON (L.). —
Trois nouveaux sérotypes d'*Arizona* . . . 236
— Voir EDWARDS (P. R.).
- FREDETTE (V.). — Voir VINET (G.).
- GASTAL (R.). — Action de la spiramycine sur l'infection expérimen-
tale de la souris par *H. pertussis* . . . 636
- GASTINEL (P.), HAMELIN (A.), VAISMAN (A.) et DUNOYER (F.). —
Recherches sur la lyophilisation et la conservation par le
froid de quelques spirochètes . . . 249
- GHYSELS (G.). Voir OYE (E. VAN).
- GIUNTINI (J.). — Voir ROGER (F.).
- GLAUDOT (A.). — Voir OYE (E. VAN).
- GOVAERTS (A.). — Anticorps normaux et pouvoir lipo-floculant . . 31
- GRELET (N.). — Voir IONESCO (H.).
- GRUMBACH (F.). — Activité antituberculeuse expérimentale du
pyrazinamide . . . 694
- GUILLOT (P.). — Culture du virus de la fièvre aphteuse (type O) en
cultures de tissus de reins de porc. Etude au microscope
électronique . . . 571
- HALPERN (B. N.). — Voir BIOZZI (G.).
- HAMELIN (A.). — Voir GASTINEL (P.).
- HIRSCH (H.). — Voir PATTE (J. C.).
- IONESCO (H.) et GRELET (N.). — Développement abortif d'un phage
de *B. megaterium* . . . 753
- IZARD (Y.) et BOQUET (P.). — Recherches sur les venins de *Vipera*
Xanthina palestinae et d'*Echis carinata* . . . 583
- JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). — Essai d'immunisation du rat blanc
contre la brucellose. II . . . 372

- JACOTOT (H.), VALLÉE (A.) et VIRAT (B.). — Sur l'immunisation contre le virus du myxome infectieux par inoculation de virus du fibrome de Shope 282
- — — Sur la conservation dans les peaux des mutants atténués du virus du myxome 502
- — — Etude du neuromyxome 549
- JACQUELINE (F.). — Voir PODLIACHOUK (L.).
- KIRSCHÉ (P.). — Voir LE MINOR (L.).
- LAFOURCADE (S.). — Voir PEYNAUD (E.).
- LAHAYE (M.). — Infection abortive d'un colibacille par un phage. 97
- LAMY (L.) et MOLINARI (V.). — Etude expérimentale de l'activité de substances antibiotiques sur *Entamoeba histolytica* en culture dans ses rapports avec la flore bactérienne associée. 655
- LAPRESLE (C.) et DURIEUX (J.). — Etude de la dégradation de la sérum-albumine humaine par un extrait de rate de lapin. V. Antigénicité de l'albumine dégradée 38
- LAVERGNE (D.). — Voir AUGIER (J.).
- LE CORROLLER (Y.). — A propos de la transformation de souches banales de *B. cereus* Frank et Frank en souches cristallophores pathogènes pour les insectes 670
- LE MINOR (L.). — La notion d'espèce dans le groupe *Salmonella*. 207
- LE MINOR (S.), KIRSCHÉ (P.), BAYLET (R.) et CHARÉ-MARSAINES (C.). — Un nouveau sérotype de *Salmonella* : *S. mbao* . . 785
- — et NICOLLE (P.). — La lysine-décarboxylase des sérotypes des *E. coli* de gastro-entérite du nourrisson 786
- Voir EDWARDS (P. R.).
- Voir FIFE (M. A.).
- LE NOC (P.) et MOUSTARDIER (G.). — A propos d'infections intestinales à *Alcaligenes faecalis* et leur analogie avec les syndromes intestinaux à *Moraxella lwoffii* 435
- LÉPINE (P.). — Voir CROISSANT (O.).
- Voir PEARSON (H. E.).
- LE TELLIER (H.). — Voir MONNET (P.).
- LEVADITI (J.-C.). — Voir PRÉVOT (A. R.).
- LEVY (G.). — Voir POLONOVSKI (J.).
- LIBERMANN (C.). — Etude de quelques souches de *M. tuberculosis* INH-résistantes et fortement pathogènes pour le cobaye. I. Description des souches 310
- LOISELEUR (J.). — La désépécification du sérum sanguin . . . 272
- LOUISOT (P.). — Voir COLOBERT (L.).
- LUTZ (A.) et WITZ (M. A.). — De l'action tuberculeuse de la streptovaricine *in vitro* et *in vivo* chez le cobaye . . . 61
- LWOFF (A.). — L'espèce bactérienne 137
- MATHIEU (N.) et FAGUET (M.). — Activité *in vitro* de la spiramycine en association avec la tétracycline, l'érythromycine, la

pénicilline, la streptomycine, sur la multiplication de <i>S. aureus</i> , étudiée au microbiophotomètre	69
MÉNANTAUD et BRISOU (J.). — Etude d'une souche d' <i>Acinetobacter polymorpha</i>	132
MILLOT (P.), SAINT-PAUL (M.) et VERMA (P.). — La réaction de Prausnitz-Küstner en immunologie expérimentale. Application à l'étude d'immunanticorps anti-thrombocytaires, anti-hépatiques et anti-globuliniques	598
— Voir WROBLEWSKI (A.).	
MINCK (R.), KIRN (A.) et GALLERON. — Données apportées par l'utilisation des milieux synthétiques sur la transformation L du <i>Proteus</i> P 18	791
MIR CHAMSY (H.) et SADEGH (A.). — Mise en application des théories sur l'extraction de la toxine tétanique endocellulaire. I. Action de la pénicilline	396
— et NAZARI (F.). — Mise en application des théories sur l'extraction de la toxine tétanique endocellulaire. II. Action de la trypsine	399
— III. La cryoextraction de la toxine tétanique endobacillaire.	402
MOLLARET (L.) et CHAMFÉUIL (R.). — Apparition du genre <i>Serratia</i> en pathologie humaine	643
MONNET (P.), LE TELLIER (H.) et DREVON (A.). — La recherche du bactériophage dans les eaux par la technique au chloroforme	386
MORÉLIS (P.). — Voir COLOBERT (L.).	
MOUSTACCHI (E.). — « L'effet oxygène » dans l'irradiation X de micro-organismes déficients en enzymes de la respiration aérobie	89
MOUSTARDIER (G.). — Voir LE NOC (P.).	
MOUTON (D.). — Voir BIOZZI (G.).	
NAMIOKA (S.) et SAKAZAKI (R.). — Etude sur les <i>Rettingerella</i>	485
NAZARI (F.). — Voir MIR CHAMSY (H.).	
NAZIMOFF (O.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).	
NICOLLE (P.). — Voir LE MINOR (L.).	
ORFILA (J.). — Sensibilité <i>in vitro</i> de 26 souches de pleuropneumonia-like-organisms à l'action d'agents chimiothérapeutiques.	516
— Etude de l'action cytopathogène de l'adénovirus type 7 en cultures cellulaires	794
— Voir FABIANI (M. G.).	
ORIO (J.) et VARGUES (R.). — Tampon physiologique (tampon de Mayer et Levine) et pouvoir anti-complémentaire	538
— Voir VARGUES (R.).	
OYE (E. VAN), GHYSELS (G.) et GLAUDOT (A.). — Un nouveau sérotype du groupe <i>Salmonella</i> isolé au Congo belge : <i>S. kin-tambo</i>	390

- PATTE (J.-C.), HIRSCH (H.) et CHABBERT (Y.). — Etude des courbes d'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques . . . 621
- PEARSON (H. E.), ATANASIU (P.) et LÉPINE (P.). — La multiplication du virus rabique dans un astrocytome transmissible chez la souris 1
- PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — Les équilibres vitaminiques chez les levures 78
- PIÉCHAUD (D.) et SZTURM-RUBINSTEN (S.). — A propos de trois coliformes ayant des antigènes communs avec *Shigella sonnei* en phase II 376
- Voir PIÉCHAUD (M.).
- PIÉCHAUD (M.), SZTURM-RUBINSTEN (S.) et PIÉCHAUD (D.). — Evolution histologique de la kérato-conjonctivite à bacilles dysentériques du cobaye 298
- PLAISANCE (G.). — Voir POCHON (J.).
- POCHON (J.) et BARJAC (H. DE). — Interactions entre la croissance des *Azotobacter* et celle du maïs 419
- PLAISANCE (G.) et BARJAC (H. DE). — Gleyification et déboisement en forêt du Jura. Incidences microbiologiques . . 226
- Voir AUGIER (J.).
- PODLIACHOUK (L.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). — Le diagnostic de la polyarthrite chronique évolutive par agglutination des globules rouges humains sensibilisés 659
- JACQUELINE (F.) et EYQUEM (A.). — Le facteur sérique Gma au cours des rhumatismes inflammatoires chroniques . . 590
- et WROBLEWSKI (A.). — Recherche de substances de groupes sanguins chez les chevaux et les mulets 748
- Voir WROBLEWSKI (A.).
- POLONOVSKI (J.) et LEVY (G.). — Compétition entre le pouvoir bactériostatique des saponiums et l'abondance de facteurs de croissance 392
- PONCET (G.). — Voir FAYET (M.-Th.).
- PRÉVOT (A.-R.), LEVADITI (J.-C.), NAZIMOFF (O.) et THOUVENOT (H.). — Circonstances d'apparition et évolution de la réticulose plasmodiale qui caractérise certaines formes de corynébactériose expérimentale du lapin 405
- RENOUX (G.). — La notion d'espèce dans le genre *Brucella* . . . 179
- ROCHE (A.). — Activation biologique des sols carencés en P, par addition de phosphates naturels 673
- ROGER (A.) et ROGER (F.). — Les corps élémentaires des virus « visibles » constituent de véritables équivalents « L » de microorganismes rickettsiens ; le retour à la phase rickettsienne des cultures le démontre péremptoirement . . . 521
- — La phase rickettsienne des virus du groupe psittacose-lymphogranulomatose et son mécanisme de division . . 667

- ROGER (A.). — Voir ROGER (F.).
- ROGER (F.) et ROGER (A.). — Quelques remarques sur le développement des virus du groupe de la psittacose 128
- — Les affinités tinctoriales des rickettsies et des gros virus visibles. I. II et III 126, 230 et 233
- — Le virus de l'avortement de la brebis ; son pouvoir pathogène pour le névraxe ; sa parenté avec le virus lymphogranulomateux 379
- — Sur l'hétéro-allergie dans les rickettsioses et, en particulier, sur quelques phénomènes de Sanarelli-Shwartzman survenus spontanément chez des animaux de laboratoire. 525
- GIUNTINI (J.) et ROGER (A.). — Affinités tinctoriales des rickettsies. IV. Colorabilité de *R. burneti* après agitation en présence d'éther 663
- Voir ROGER (A.).
- ROSENTHAL (S. R.). — Voir WILLISTON (E. H.).
- SADEGH (A.). — Voir MIR CHAMSY (H.).
- SAINT-PAUL (M.). — Voir MILLOT (P.).
- SCHAEFFER (P.). — La notion d'espèce après les recherches récentes de génétique bactérienne 167
- SAENZ (A.). — L'infection expérimentale du hamster par *M. balnei*. 442
- STAMATIN (N.) et CRISTESCU (P.). — Titration du sérum anti-charbonneux sur le hamster doré 243
- STANISLAVSKY (E. S.). — Voir VARPHOLOMEEVA (A. A.).
- STIFFEL (C.). — Voir BIOZZI (G.).
- SUIRE (A.). — Recherches sur la dissociation spontanée des *Pseudomonas* 351
- SZTUM-RUBINSTEN (S.). — Pouvoir pathogène expérimental et sensibilité au lysozyme des cultures de *Shigella* 508
- Voir PIÉCHAUD (D.).
- Voir PIÉCHAUD (M.).
- THIBAUT (P.). — La notion d'espèce dans le genre *Shigella* 213
- THOUVENOT (H.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- TYSET (C.). — Voir BRISOU (J.).
- VACHER (B.). — Voir BRISOU (J.).
- VAISMAN (A.). — Voir GASTINEL (P.).
- VALLÉE (A.). — Voir JACOTOT (H.).
- VARGUES (R.) et ORIO (J.). — Cryoagglutination, complément et pouvoir anti-complémentaire 533
- Voir ORIO (J.).
- VARPHOLOMEEVA (A. A.) et STANISLAVSKY (E. S.). — Recherches sur la morphologie des leptospires à l'aide du microscope électronique 361
- VENDRELY (R.). — La notion d'espèce à travers quelques données biochimiques récentes. Le cycle L 142
- VERMA (P.). — Voir MILLOT (P.).

- VÉRON (M.). — Antigènes précipitants de la tuberculine purifiée
I. P. 48 et des fractions chimiques dérivées 123
- VIALIER (J.) et CAYRÉ (R.-M.). — Evolution de la sensibilité à trois
antibiotiques anti-tuberculeux des souches de *M. tubercu-*
losis isolées entre 1953 et 1957 de produits pathologiques
humains 505
- VIDEAU (D.). — Sur le mode d'action des antibiotiques ; cas parti-
culier de la spiramycine 709
- VINET (G.) et FREDETTE (V.). — Acides aminés libres du bouillon VF
et toxinogénèse chez *Plectridium tetani* 530
- VIRAT (B.). — Voir JACOTOT (H.).
- WILLISTON (E. H.), BINGENHEIMER (J.) et ROSENTHAL (S. R.). — Trace
elements and BCG cultures 49
- WILSSENS (A.) et BUTTIAUX (R.). — Les bactéries de la flore fécale
de la vache saine 332
- WITZ (M. A.). — Voir LUTZ (A.).
- WROBLEWSKI (A.). — Voir PODLIACHOUK (L.).
— PODLIACHOUK (L.) et MILLOT (P.). — Recherche de substances
de groupes sanguins dans le sérum et la salive des bovins. 456
- WYCKOFF (R. W. G.). — Voir CROISSANT (O.).
-

TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 94

<i>Adénovirus</i> . Aspects distinctifs des lésions en cultures de tissus	724
— Action cytopathogène de l'— type 7	794
<i>Alcaligenes faecalis</i> . Rapports entre infections intestinales à — — et à <i>Moraxella lwoffii</i>	435
<i>Amibes</i> . Activité de substances antibiotiques sur <i>E. histolytica</i> en culture dans ses rapports avec la flore bactérienne associée	655
<i>Anaérobies</i> . Etude d'une souche d' <i>Acinetobacter polymorpha</i>	132
— Les <i>Achromobacter</i> nitrates-réducteurs sans action sur les glu- cides et les protéines	369
— Apparition et évolution de la réticulose plasmodiale dans cer- taines formes de corynébactériose expérimentale du lapin	405
— Etude sur <i>Achromobacter desmolyticus</i> isolé d'un élevage de grenouilles	775
<i>Antibiotiques</i> . Activité <i>in vitro</i> sur la multiplication de <i>Staphy- lococcus aureus</i>	69
— Courbes d'effet bactériostatique des associations d'—	621
— Voir aussi <i>Saponiums</i> et aux différents antibiotiques.	
<i>Anticorps</i> . — normaux et pouvoir lipofloculant	31
<i>Antigènes</i> . Antigénicité de la sérumalbumine humaine dégradée par un extrait de rate de lapin	38
<i>Arizona</i> . Trois nouveaux sérotypes d'—	236
— Cinq nouveaux sérotypes isolés de reptiles	782
<i>Avortement</i> . Pouvoir pathogène pour le névraxe du virus de l'— de la brebis et sa parenté avec le virus lymphogranulomateux	379
<i>Azotobacter</i> . Voir <i>Sol</i> .	
<i>BCG</i> . Oligo-éléments et cultures de —	19
<i>B. tuberculeux</i> . Culture des — — sur papier filtre	238
— Souches de — — INH-résistantes et fortement pathogènes pour le cobaye	310
— L'infection expérimentale du hamster par <i>M. balnei</i>	442
— Evolution de la sensibilité à trois antibiotiques des souches isolées entre 1953 et 1957	505
<i>Bactériologie générale</i> . Uniformité des altérations morphologiques chez les bactéries soumises à des agressions diverses. Structure granulaire du protoplasma	463
<i>Bactériophage</i> . Infection abortive d'un colibacille par un —	97
— Recherche du — dans les eaux par la technique au chloroforme	386

<i>Bactériophage</i> . Production induite de mégacine en milieu synthétique	474
— Développement abortif d'un — de <i>B. megaterium</i>	753
<i>Biochimie</i> . Voir <i>Espèce</i> .	
<i>Brucella</i> . La notion d'espèce dans le genre —	179
— Essai d'immunisation du rat blanc contre la brucellose	372
<i>Charbon</i> . Titrage du sérum anti-charbonneux	243
<i>Coliformes</i> . Trois — ayant des antigènes communs avec <i>S. sonnei</i> en phase II	376
<i>Collagène</i> . Action de divers polyosides sur du — natif	7
<i>Complément</i> . Cryoagglutination et pouvoir anticomplémentaire.	533
— Tampon physiologique et pouvoir anticomplémentaire	538
— Détermination du taux du — dans différentes espèces animales.	541
— Taux du — en fonction du titre des agglutinines anti-A et anti-B	545
<i>Corynébactériose</i> . Voir <i>Anaérobies</i> .	
<i>Déspécification</i> . Voir <i>Sérum</i> .	
<i>Distomatose</i> . Les — hépatiques humaines en France	256
<i>Effet oxygène</i> . L'— — dans l'irradiation X de microorganismes déficients en enzymes de la respiration aérobie	89
<i>Entérocoques</i> . Nouveau milieu sélectif pour l'isolement des —	120
<i>Enzymes</i> . Voir <i>Escherichia coli</i> .	
<i>Escherichia coli</i> . La lysine-décarboxylase des — — de gastro-entérite du nourrisson	786
<i>Espèce</i> . L'— bactérienne	137
— La notion d'— à travers quelques données biochimiques récentes. Le cycle L	142
— La notion d'— après les recherches récentes de génétique bactérienne.	167
— Voir aussi <i>Brucella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> .	
<i>Fibrome</i> . Voir <i>Myxome</i> .	
<i>Fièvre aphleuse</i> . Cultures du virus de la — — en culture de tissus de reins de porc. II. Etude au microscope électronique de l'évolution des cellules infectées	571
— Immuno-électrophorèse du virus aphteux	732
<i>Flore intestinale</i> . Les bactéries de la flore fécale de la vache saine.	332
<i>Formes L</i> . Transformation L du <i>Proteus</i> P 18	791
— Voir aussi <i>Espèce</i> , <i>Psittacose-lymphogranulomateuse</i> .	
<i>Gastro-entérite</i> . Voir <i>Escherichia coli</i> .	
<i>Génétique</i> . Voir <i>Espèce</i> .	
<i>Grippe</i> . Diagnostic de l'infection du liquide allantoïque par une méthode colorimétrique	512
— Inhibition de la multiplication du virus par la thio-paratoluidine et ses dérivés	514
<i>Groupes sanguins</i> . Recherche de substances de — — dans le sérum et la salive des bovins	456

<i>Groupes sanguins</i> . Le facteur Gma au cours des rhumatismes inflammatoires chroniques	590
— Recherche de substances de — — chez les chevaux et les mulets	748
— Voir aussi <i>Complément</i> , <i>Immunologie</i> .	
<i>Hemophilus pertussis</i> . Le sérum anti-coquelucheux s'oppose à la sensibilisation consécutive à la vaccination de la souris par — — .	341
<i>Immunologie</i> . La réaction de Prausnitz-Küstner	598
<i>Insectes</i> . La transformation des souches banales de <i>B. cereus</i> en souches cristallophores pathogènes pour les —	670
<i>Kérato-conjonctivite</i> . — — à b. dysentérique du cobaye	298
<i>Leptospires</i> . Etude au microscope électronique de la morphologie des —	361
<i>Levures</i> . Equilibres vitaminiques chez les —	78
<i>Lymphogranulomatose</i> . Voir <i>Psittacose-lymphogranulomatose</i> .	
<i>Maïs</i> . Voir <i>Sol</i> .	
<i>Moraxella lwoffii</i> . Voir <i>Alcaligenes faecalis</i> .	
<i>Myxome</i> . Immunisation contre le virus du — par le virus du fibrome de Shope	282
— Conservation dans les peaux des mutants atténués du virus du —	502
— Etude expérimentale du neuromyxome	549
<i>Paludisme</i> . Résistance naturelle du lapin à <i>P. berghei</i> . Analyse des facteurs immunologiques	428
<i>PPLO</i> . Sensibilité <i>in vitro</i> de 28 souches à l'action d'agents chimiothérapeutiques.	516
<i>Protéines</i> . Synthèse de — « anormales » chez <i>E. coli</i> K12 en présence de L-valine	15
<i>Pseudomonas</i> . Dissociation spontanée des —	351
<i>Psittacose-lymphogranulomatose</i> . Mécanisme de la différenciation des gros virus avec la coloration de Macchiavello	126
— Remarques sur le développement des virus du groupe de la — — .	128
— Colorabilité des gros virus par le Macchiavello	230
— Colorabilité des gros virus par le Giemsa	233
— Les corps élémentaires des virus « visibles » constituent des équivalents « L » de microorganismes rickettsiens	521
— La phase rickettsienne des virus du groupe — — et son mécanisme de division	667
— Voir aussi <i>Avortement</i> , <i>Rickettsies</i> .	
<i>Pyrazinamide</i> . Activité expérimentale du	694
<i>Rage</i> . Multiplication du virus rabique dans un astrocytome de la souris	1
— Le sérum antirabique dans le traitement des morsures de la face au Nord Vietnam	384

<i>Rage</i> . Autostérilisation et guérison dans la — expérimentale . . .	739
<i>Reitgerella</i> . Etude sur les	485
<i>Rhumatismes</i> . Le diagnostic de la polyarthrite chronique évolutive par agglutination des globules rouges sensibilisés . . .	659
— Voir aussi <i>Groupes sanguins</i> .	
<i>Rickettsies</i> . Mécanisme de la différenciation avec le Macchiavello . . .	126
— Coloration des — par le Macchiavello	230
— Colorabilité des — par le Giemsa	233
— L'hétéro-allergie dans les rickettsioses	525
— Colorabilité de <i>R. burneti</i> après agitation en présence d'éther . . .	663
<i>Salmonella</i> . La notion d'espèce dans le groupe —	207
— Nouveau sérotype de — isolé au Congo belge	390
— Un nouveau sérotype de — : <i>S. mbao</i>	785
<i>Sanarelli-Shwartzman</i> . Voir <i>Rickettsies</i> .	
<i>Saponiums</i> . Compétition entre le pouvoir bactériostatique des — et l'abondance des facteurs de croissance	392
<i>Serratia</i> . Apparition du genre — en pathologie humaine	643
<i>Sérum</i> . La désépécification du sérum sanguin	272
<i>Sérumalbumine</i> . Voir <i>Antigènes</i> .	
<i>Shigella</i> . La notion d'espèce dans le groupe —	213
— Pouvoir pathogène expérimental et sensibilité au lysozyme . . .	508
<i>Sol</i> . Glycification et déboisement ; incidences microbiologiques . . .	226
— Interactions entre la croissance des <i>Azotobacter</i> et celle du maïs . .	419
— Numération des germes telluriques par la microscopie directe en lumière blanche et en fluorescence	615
— Activation biologique de sols carencés en P, par addition de phosphates naturels	673
— Numération de la flore totale et microstructure des —	766
<i>Spiramycine</i> . Activité <i>in vitro</i> de la — en association avec d'autres antibiotiques sur la multiplication de <i>St. aureus</i>	59
— Action de la — sur l'infection expérimentale de la souris par <i>H. pertussis</i>	636
— Mode d'action de la —	709
<i>Spirochètes</i> . Lyophilisation et conservation par le froid de quel- ques —	249
<i>Streptocoques</i> . Les — fécaux des intestins humains et animaux . . .	778
<i>Streptovaricine</i> . Action <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> dans la tuberculose du cobaye	61
<i>Système réticulo-endothélial</i> . Fonction phagocytaire au cours du développement de tumeurs malignes expérimentales	681
<i>Tétanos</i> . Action de la pénicilline sur l'extraction de la toxine téta- nique endocellulaire	396
— Action de la trypsine sur l'extraction de la toxine tétanique endocellulaire	399
— La cryoextraction de la toxine tétanique endocellulaire	402

<i>Tétanos</i> . Acides aminés libres du bouillon VF et toxinogénèse chez <i>Pl. tetani</i>	530
<i>Toxine</i> . Voir <i>Tétanos</i> .	
<i>Tuberculine</i> . Antigènes précipitants de la — purifiée I. P. 48 et ses fractions	123
<i>Tuberculose</i> . Voir <i>B. tuberculeux</i> , <i>Streptovaricine</i> .	
<i>Tumeurs</i> . Voir <i>Système réticulo-endothélial</i> .	
<i>Vaccine</i> . Etude au microscope électronique du développement du virus vaccinal	294
<i>Variole</i> . Comportement du virus de la — en culture de tissus . .	560
— Diagnostic de la — au laboratoire	577
<i>Venins</i> . Recherches sur le — de <i>Vipera Xanthina palestinae</i> et d' <i>Echis carinata</i>	583
<i>Virus</i> . Voir aux différents virus.	

TABLE DES OUVRAGES PRÉSENTÉS OU REÇUS

DU TOME 94

ALEXANDER (P.). — <i>Atomic radiation and life</i>	679
BRACHET (J.). — <i>Biochemical cytology</i>	548
CHÈVREMONT (M.). — <i>Notions de cytologie et histologie</i>	798
<i>Ciba Foundation Symposium on drug resistance in microorganisms.</i>	798
HARRISON (G. A.). — <i>Chemical methods in clinical medicine</i> . . .	136
HEVESY (G. C. DE), FORSSBERG (A. G.) et ABBOTT (J. D.). — <i>Advances in radiobiology. Proceedings of the Fifth International Congress on Radiobiology</i>	136
<i>Infestations à Trichomonas. Premier Symposium européen</i> . . .	404
KLYNE (W.). — <i>The chemistry of steroids</i>	548
LANG (K.). — <i>Biochemie der Ernährung</i>	247
McILWAIN (H.). — <i>Chemotherapy and the central nervous system.</i>	679
OSWALD (N. C.). — <i>Recent trends in chronic bronchitis</i>	680
POCHON (J.) et BARJAC (H. DE). — <i>Traité de Microbiologie des sols.</i>	679
PRÉVOT (A.-R.). — <i>Manuel de classification et de détermination des Bactéries anaérobies, 3^e édition</i>	247
RAMIOUL (H.). — <i>Le danger des radiations pour l'homme</i>	680
SEVITT (S.). — <i>Burns. Pathology and therapeutic application</i> . . .	548
SHOPPEE (C. W.). — <i>Chemistry of the steroids</i>	680

Printed in France.

Le Gérant : G. Masson.

Dépôt légal. — 1958. — 2^e trimestre. — Numéro d'ordre 2882. — Masson et Cie, édit., Paris.
Anc^{ne} Imp. de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette, Paris.

DATE DUE

DEMCO 38-297